

TALITA HARAMI

**INFLUÊNCIA DE *K/Rox1p* NO METABOLISMO FERMENTATIVO DE
*Kluyveromyces lactis***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TALITA HARAMI

**INFLUÊNCIA DE *K/Rox1p* NO METABOLISMO FERMENTATIVO DE
*Kluyveromyes lactis***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2009

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Co-orientador)

Prof^a. Denise Mara Soares Bazzolli

Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti

Dr^a. Juliana Rocha Lopes Soares
Ramos

Prof^a. Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

Dedico este trabalho:

A Deus

Aos meus pais, Clara e Mário

Aos meus irmãos, Tatiane e Robson

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da existência e da evolução espiritual.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade em realizar o curso de mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais, Mario e Clara, por todo apoio incondicional desde meu nascimento.

Aos meus irmãos, Tatiane e Robson, pela preocupação, carinho e apoio.

A minha orientadora, professora Flávia Maria Lopes Passos, por toda confiança e apoio em meu trabalho, mas principalmente, pela amizade compartilhada durante todo esse tempo.

Ao professor Luciano Gomes Fietto, pela co-orientação, por ter sido sempre tão prestativo e pelos conselhos notáveis para a realização e conclusão do trabalho.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pela co-orientação e participação no aprimoramento do projeto.

À professora Denise Mara Soares Bazzoli por toda força e preocupação, além dos conselhos notáveis para o aprimoramento do trabalho.

À Dr^a. Juliana Rocha Lopes Soares Ramos, pela ajuda na técnica de Real Time, pelos conselhos notáveis para o aprimoramento do trabalho e pela participação na banca.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pelos conselhos notáveis e pela participação na banca.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia: Virgínia, Danilo, Toninho, Paulo, Evandro, Pablo, Júlio, Nilcéia, Laura e Rejane.

A todos aqueles que passaram e estão no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, por toda amizade compartilhada: Agenor, Ancély, Cássia, Claudia, Fábio, Prof. Galvão, Guilherme, Júlio, Liliane, Lívia, Lygia, Marcelo, Mariana, Mariana (bio), Marina, Marisa, Otávio, Paula, Priscila, Rafael Cunha, Rafael Wesley, Raphael Hermano, Rodrigo, Tatiana Rigamonte, Tatiane, Valdilene, Vanessa, Dr^a Virgínia, Wanessa, Wendel, Yaro.

Aos amigos dos Laboratórios de Microbiologia Industrial, Genética, Micorrizas, Petróleo, Microbiologia de Alimentos, Petróleo e Café

Ao Raphael Hermano, por ter me proporcionado a força para continuar caminhando nos momentos mais difíceis.

Aos meus sempre amigos e irmãos, pelo carinho e apoio, Adriana Ponce, Angélica, Andréia Cristina, Agenor, Carin, Daniel, Eliana, Gleyce, Jefferson Juliana, Lilian, Lívia, Lygia, Maíra, Maísa, Miti, Rodrigo, Roberto, Sayaka, Silvana, Sofia, Swiany, Tássia, Thiago e Thiara.

A todas as meninas da república, pela convivência agradável e amizade, Andréia, Joyce, Juliana, Marina, Silvana e Thiara.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

TALITA HARAMI, filha de Mario Mituro Harami e Clara Yuriko Harami, nasceu em 09 de outubro de 1981, em Madureira, Rio de Janeiro.

Em março de 2001, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, em 06 de outubro de 2006.

Em outubro de 2006, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 16 de fevereiro de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. MICRORGANISMOS UTILIZADOS	13
3.2. PERFIL DE CRESCIMENTO DE <i>K. lactis</i> MW270-7B E <i>K. lactis rox1Δ</i> EM FONTES DE CARBONO FERMENTÁVEIS E NÃO FERMENTÁVEIS	14
3.3. CAPACIDADE FERMENTATIVA DE <i>K. lactis</i> MW270-7B E <i>K. lactis rox1Δ</i>	14
3.4. EXPRESSÃO GÊNICA E METABOLISMO NA TRANSIÇÃO AEROBIOSE-HIPOXIA DE <i>K. lactis</i> MW270-7B E <i>K. lactis rox1Δ</i>	15
3.5. ANÁLISE DO PRODUTO METABÓLICO	15
3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA DA ÁLCOOL DESIDROGENASE	16
3.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	17
3.7.1. Extração de RNA total	17
3.7.2. Síntese de cDNA	18
3.7.3. Seleção e desenho de oligonucleotídeos iniciadores	19
3.7.4. Análise da região promotora	20
3.7.5. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em Tempo Real	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. PERFIL DE CRESCIMENTO DE <i>K. lactis</i> MW270-7B E <i>K. lactis rox1Δ</i> EM FONTES DE CARBONO FERMENTÁVEIS E NÃO FERMENTÁVEIS	22

4.2. CAPACIDADE FERMENTATIVA DE <i>K. lactis</i> MW270-7B E <i>K. lactis rox1A</i>	24
4.3. EXPRESSÃO GÊNICA E METABOLISMO DURANTE TRANSIÇÃO AEROBIOSE-HIPOXIA DE <i>K. lactis</i> MW270-7B E <i>K. lactis rox1A</i>	25
4.3.1. Análise da região promotora	25
4.3.2. Expressão dos possíveis genes alvos de <i>KIRox1p</i>	26
4.3.3. Metabolismo e expressão gênica da álcool desidrogenase I (<i>KIADHI</i>)	30
4.3.4. Expressão de genes que codificam o fator de transcrição (<i>KIHAPI</i>) e o transportador de glicose de baixa afinidade (<i>KIRAG1</i>)	33
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
APÊNDICES	46
APÊNDICE A	47
APÊNDICE B	49

RESUMO

HARAMI, Talita, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Influência de *K/Rox1p* no metabolismo fermentativo de *Kluyveromyces lactis***. Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Co-orientadores: Luciano Gomes Fietto e Hilário Cuquetto Mantovani.

Esse trabalho é uma contribuição aos estudos sobre a função de *K/Rox1p* no metabolismo fermentativo de *Kluyveromyces lactis*. *Rox1p* é conhecida em *Saccharomyces cerevisiae* por reprimir, em aerobiose, genes que são expressos em condição limitante de oxigênio. A cinética de crescimento de linhagens de *Kluyveromyces lactis* MW270-7B e sua mutante derivativa *K. lactis* MW270-7B *rox1Δ* foi realizada em meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) contendo fontes de carbono fermentáveis (glicose e lactose) ou não fermentáveis (glicerol e etanol) para determinar o perfil de crescimento nessas fontes. Além disso, ambas as linhagens tiveram sua capacidade fermentativa avaliada na presença de um inibidor da cadeia transportadora de elétrons, antimicina A, em meio YPD (extrato de levedura, peptona e glicose). Os resultados indicaram que a ausência de *KIROX1* não favoreceu o crescimento em fontes de carbono fermentáveis, mas favoreceu em fontes de carbono não fermentáveis. A maior capacidade fermentativa de *K. lactis rox1Δ* foi confirmada pelo maior rendimento de etanol por biomassa detectada, na ausência e presença de antimicina A (10 e 20 μM). As linhagens mutante *rox1* e controle também foram cultivadas em YNB e glicose em regime contínuo ($D=0,1\text{h}^{-1}$) sob aerobiose e, em seguida, submetidas à hipoxia por 9 horas. Amostras foram coletadas a cada 3 horas para análise da expressão de possíveis genes alvos de *K/Rox1p*, bem como de etanol e da atividade da álcool desidrogenase (ADH). Para análise da expressão gênica, sequências de

reconhecimento por *K/Rox1p* foram pesquisadas *in silico* nos promotores dos genes *KIAAC3*, *KICOX5B*, *KIHEM13*, *KIHAP1*, *KIRAG1* e *KIADH1* e foram encontradas divergindo de dois nucleotídeos da sequência consenso *YYYATTGTTCTC*. *K/Rox1p* mostrou ter efeito negativo sobre as expressões de *KIAAC3* e *KIHEM13* em aerobiose, mas não pareceu atuar sobre *KICOX5B*. A concentração de etanol, a atividade da ADH e a expressão de *KIADH1* evidenciaram o metabolismo mais fermentativo de *K. lactis rox1Δ* tanto em aerobiose quanto em hipoxia. E, por um mecanismo ainda desconhecido, *K/Rox1p* atuou sobre as expressões de *KIHAP1* e *KIRAG1*. A influência de *K/Rox1p* na expressão de *KIADH1*, *KIRAG1* e *KIHAP1*, sugere a participação de *K/Rox1p* no controle de pontos chaves do metabolismo fermentativo: entrada da glicose, que determina o fluxo para a manutenção de uma via fermentativa, bem como na reação redutiva final, que culmina com a formação de etanol. A existência de genes que mostraram ser regulados negativamente por *K/Rox1p* em aerobiose, como *KIAAC3* e *KIHEM13*, indica a existência em *K. lactis* de mecanismo de regulação transcricional por oxigênio que visa melhor utilizar o oxigênio numa condição limitante, semelhante à função de *Rox1p* em *Saccharomyces cerevisiae*. Esse mecanismo, entretanto, parece não estar relacionado apenas com as concentrações de oxigênio, mas também com metabolismo de carbono fermentável ou não fermentável.

ABSTRACT

HARAMI, Talita, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2009. **Influence of *K/Rox1p* on fermentative metabolism of *Kluyveromyces lactis*.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co-advisers: Luciano Gomes Fietto and Hilário Cuquetto Mantovani.

This work is a contribution to the studies about the role of *K/Rox1p* in fermentative metabolism of *Kluyveromyces lactis*. *Rox1p* is known in *Saccharomyces cerevisiae* by repressing in aerobic conditions genes that are expressed when oxygen is limited. The kinetics growth of lineages of *Kluyveromyces lactis* MW270-7B and its derivative mutant *K. lactis* MW270-7B *rox1Δ* was carry out on YNB media (Yeast Nitrogen Base) containing fermentative carbon sources (glucose and lactose) or non fermentative carbon sources (glycerol and ethanol) to determine the growth profile on this sources. Besides both yeasts had its fermentative capacity researched in the presence of an inhibitor of electron chain carrier, antimycin A on YPD (yeast extract, peptone and glucose). The results indicated that the absence of *KIROX1* didn't favor the growth in fermentative carbon sources, but it favored in non fermentative carbon sources. The more fermentative capacity of *K. lactis rox1Δ* was confirmed for the higher ethanol yield for biomass detected in the absence and presence of antimycin A (10 and 20 μM). The lineages *rox1* mutant and control were also cultivated on YNB plus glucose under aerobic continuous culture ($D = 0,01 \text{ h}^{-1}$) and later they were submitted to a hypoxic condition for 9 hours. Samples were collected every 3 hours for analysis of the expression of putative target genes of *K/Rox1p* as well as analysis of ethanol and of the enzymatic activity of the alcohol desidrogenase (ADH). For the analysis of gene expression, recognition sequences for *K/Rox1p* were researched in silico in the promoters of the genes

KIAAC3, *KICOX5B*, *KIHEM13*, *KIHAP1*, *KIRAG1* and *KIADH1* and they were found diverging of two nucleotide of the consensus sequence YYYATTGTTCTC. *KIRox1p* showed to have negative effect on expression of *KIAAC3* and *KIHEM13*, but it didn't seem to act on *KICOX5B*. The ethanol concentration, the activity of ADH and the expression of *KIADH1* evidenced the metabolism more fermentative of *K. lactis rox1Δ* on aerobic and hypoxic conditions. And in a way not known, *KIRox1p* acts on expression of *KIHAP1* and *KIRAG1*. The influence of *KIRox1p* on expression of *KIADH1*, *KIRAG1* and *KIHAP1* suggests the participation of *KIRox1p* in the control of key points of the fermentative metabolism: entrance of the glucose that determine the flow for the maintenance of fermentative way, as well as in the reductive reaction end that culminates with the ethanol production. The existence of genes that showed to be regulated negatively by *KIRox1p* in aerobic condition, like *KIAAC3* and *KIHEM13*, indicates the existence in *K. lactis* of mechanism of transcriptional regulation for oxygen that intends to better use the oxygen in a limit condition, similar to the function of *Rox1p* in *Saccharomyces cerevisiae*. However that mechanism seems not just to be related with the concentrations of oxygen, but also with the carbon sources used, fermentative sources or non fermentative sources.

1. INTRODUÇÃO

Kluyveromyces lactis é uma levedura comum em leite e derivados sendo capaz de assimilar lactose como principal fonte de carbono e energia. Essa propriedade lhe confere um potencial para a fermentação de lactose presente no permeado do soro de leite, um resíduo gerado nas indústrias de laticínios.

Interesses industriais associados a interesses científicos têm situado *K. lactis* como levedura modelo para estudos de fisiologia e regulação da expressão gênica de leveduras “não *Saccharomyces*”.

Saccharomyces cerevisiae e *K. lactis* são filogeneticamente próximas, entretanto, *K. lactis* possui metabolismo respiro-fermentativo mais dependente de concentrações de oxigênio, não crescendo em condições anóxicas. Ao contrário, *S. cerevisiae* exibe metabolismo predominantemente fermentativo em altas concentrações de glicose mesmo em aerobiose e não é capaz de assimilar lactose. Diferenças fisiológicas entre *S. cerevisiae* e *K. lactis* são, provavelmente, devidas às adaptações das mesmas em nichos ecológicos específicos, que em parte está relacionada à evolução de redes regulatórias específicas.

A rede regulatória que responde à concentração de oxigênio em *S. cerevisiae* envolve o grupo heme, cuja biossíntese depende da concentração de oxigênio. Heme é detectado em altas concentrações em resposta à presença de oxigênio no meio. Nessas condições aeróbias, heme ativa Hap1p (Heme Activator Protein), um fator de transcrição que induz a expressão de genes que codificam proteínas de função dependente de oxigênio, dentre os quais o gene *ROX1* (*Regulation by Oxygen*). Rox1p é um repressor de genes expressos sob hipoxia, isto é, oxigênio limitante, e, reprime a transcrição dos mesmos juntamente com o complexo de repressão geral Tup1-Ssn6. Em

hipoxia, baixas concentrações de heme não ativam Hap1p, que por sua vez não induz *ROX1*, desreprimindo, assim, genes expressos sob hipoxia.

A maioria das proteínas codificadas pelos genes expressos sob hipoxia em *S. cerevisiae* não está relacionada ao metabolismo fermentativo, mas sim às funções de respiração, proteção contra o estresse oxidativo, bem como compreendem enzimas que catalisam reações na via de biossíntese de heme, esteróis e ácidos graxos insaturados. Assim, com a desrepressão dos genes hipóxicos, a célula aumentaria a eficiência de utilização do oxigênio e/ ou ativaria vias alternativas quando uma condição limitante de oxigênio fosse estabelecida.

Em geral, existe uma baixa similaridade quando são alinhadas as seqüências de aminoácidos de fatores de transcrição de *S. cerevisiae* com as de *K. lactis*, o que pode ser esperado uma vez que os fatores de transcrição são alvos susceptíveis das pressões evolutivas. Entretanto, a conservação de alguns motivos justifica a identificação de seqüências putativas que devem exercer a mesma função do regulador transcricional em organismos relacionados.

Estudos da função de *K/Hap1p* em *K. lactis* mostraram que a mesma é expressa em aerobiose, mas tem expressão aumentada em hipoxia e, está envolvida na ativação transcricional do gene *KICYC1*. Além disso, estudos verificaram que a repressão de *K/Hap1p* sobre *KIRAG1*, que codifica o transportador de glicose de baixa afinidade, influenciou o fluxo glicolítico de modo que mutantes *hap1* apresentaram um metabolismo mais fermentativo.

Estudos conduzidos no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (BIOAGRO – UFV) com a linhagem *K. lactis* MW270-7B *rox1Δ::URA3* evidenciaram que a deleção de *KIROX1* levou a uma maior produção de etanol em relação à selvagem isogênica, numa condição de cultura em regime contínuo ($D=0,04\text{ h}^{-1}$ e $D=0,1\text{ h}^{-1}$) bem como na transição de aerobiose para hipoxia. Também foi observado um metabolismo mais fermentativo da linhagem *K. lactis* MW270-7B *rox1Δ::KanMX* em cultura contínua ($D=0,04\text{ h}^{-1}$).

Em uma análise de transcriptoma por microarranjos, observou-se que níveis de mRNA de *KIROX1* não diminuíram em condição hipóxica em comparação à condição aeróbia, diferentemente do relatado em *S.cerevisiae*. Entretanto, o transcrito de *KIROX1* não foi detectado tanto em condições aeróbias quanto hipóxicas pela técnica de *Northern blot*.

O fenótipo de um metabolismo mais fermentativo em *K. lactis* MW270-7B *rox1Δ* mostra uma ligação do fator de transcrição *K/Rox1* com o metabolismo fermentativo, o que até então não foi comprovado para *S. cerevisiae*. Esse fenótipo associado a dados do transcriptoma motivam mais estudos para o melhor entendimento de *K/Rox1p* em *K. lactis*.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo estudar a influência de *K/Rox1p* no metabolismo fermentativo de *K. lactis* por meio do estudo do perfil de crescimento em fontes de carbono fermentáveis e não fermentáveis, bem como pela avaliação da capacidade fermentativa ao inibir a cadeia transportadora de elétrons. Também foram quantificados os produtos metabólicos e realizados ensaios enzimáticos da álcool desidrogenase de amostras obtidas numa condição de transição aerobiose-hipoxia e, avaliadas as expressões de possíveis genes alvos de *K/Rox1p* nessa condição.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os organismos respondem à variação da concentração de oxigênio molecular no meio ambiente pela expressão diferencial de genes do metabolismo aeróbio *versus* anaeróbio. Em leveduras, os genes que respondem ao oxigênio compreendem aqueles que codificam para funções de respiração, proteção contra o estresse oxidativo, bem como para enzimas que catalisam reações na via de biossíntese de heme, esteróis e ácidos graxos insaturados (POYTON, 1999).

Genes cuja expressão é regulada pela concentração de oxigênio, podem ser classificados em dois grupos: genes que são eficientemente transcritos na presença de oxigênio; e, genes que são eficientemente transcritos sob condições limitantes de oxigênio (hipoxia) ou anoxia. Ainda existem diversos pares de genes em que um dos genes é expresso aerobicamente e, o outro, sob condições hipóxicas (BURKE *et al.*, 1997; KWATS *et al.*, 1998; POYTON, 1999).

A regulação da expressão de genes dependentes de concentração de oxigênio, em leveduras, é bem melhor compreendida em *Saccharomyces cerevisiae* e está correlacionada à regulação de genes do metabolismo de carbono. Entretanto, nessa levedura, a concentração da fonte de carbono é muito mais determinante no fluxo glicolítico do que o oxigênio (DE DEKEN, 1966, citado por BÄR *et al.*, 2003).

Em *S. cerevisiae*, heme, além de fazer parte de grupos prostéticos de várias proteínas e enzimas, ocupa uma função central na regulação transcricional dos genes que respondem ao oxigênio. A biossíntese de heme (Figura 1), na mitocôndria, está correlacionada à via de sinalização pelo oxigênio de maneira ainda não bem esclarecida, entretanto, sabe-se que em

condições de cultivo aeróbio, a concentração intracelular de heme é alta, em contraste ao cultivo anaeróbio, em que a concentração de heme é baixa (ZHANG e HACH, 1999; HON *et al.*, 2003). É sugerido que o nível de oxigênio controlaria a taxa de síntese de coproporfirinogênio III oxidase e protoporfirinogênio oxidase (codificadas pelo gene *HEM13* e *HEM14*, respectivamente), já que estas utilizam oxigênio como substrato na via de biossíntese de heme. Entretanto, há evidências de que a enzima porfobilinogênio sintase (codificada pelo gene *HEM2*) determine a concentração de heme, uma vez que a atividade da enzima é limitante quando há alta concentração de oxigênio, o que indicaria a existência de um sensor de oxigênio que modularia essa atividade (ZHANG e HACH, 1999).

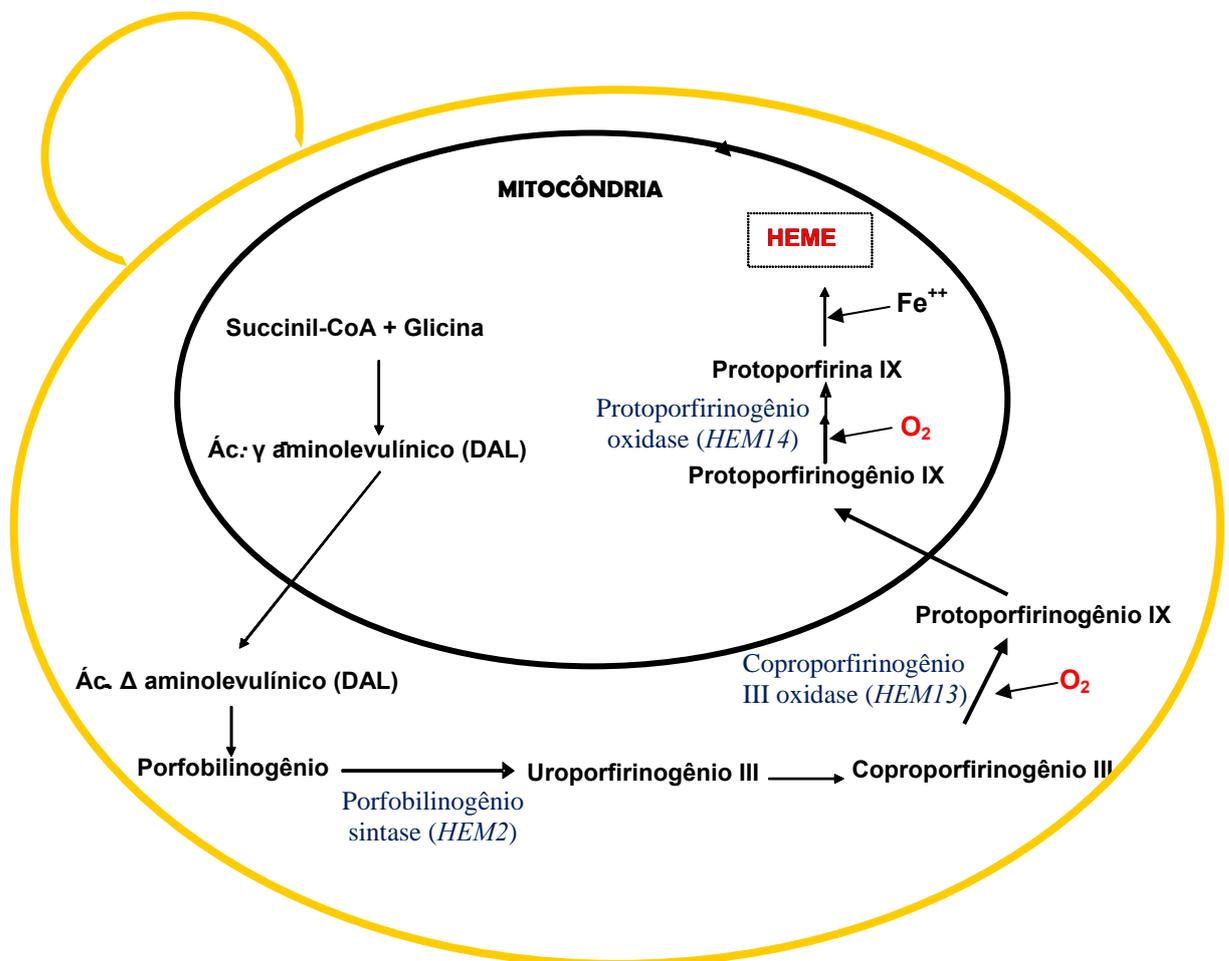


Figura 1: Via de biossíntese de heme em *S. cerevisiae*. Adaptado de ZHANG e HACH. (1999).

Heme também regula a atividade de fatores de transcrição. Uma vez sintetizado na mitocôndria em presença de oxigênio, heme exerce funções na mitocôndria ou é direcionado para outros compartimentos celulares (Figura 2). No núcleo, ativa o complexo Hap2/3/4/5, que induz a expressão de alguns genes expressos em aerobiose dependentes de fontes de carbono não fermentáveis (ex: lactato e glicerol); e, ativa, independente de fonte de carbono, o fator de transcrição Hap1 (Heme Activator Protein). Hap1p liga-se ao DNA como um homodímero (ZHANG e HACH, 1999) e induz a maioria dos genes expressos em aerobiose e alguns dos genes expressos em hipoxia (ZITOMER e LOWRY, 1992; KWAST *et al.*, 1998).

Entre os genes alvos de Hap1p estão aqueles relacionados à função de respiração (ex: *CYC1*, *CYC7* codificam para iso-1-citocromo c e iso-2-citocromo c, respectivamente), de reparo ao estresse oxidativo (ex: *CTT1*, codifica para catalase; *YHB1*, codifica para flavohemoglobina), de vias de biossíntese de heme (ex: *HEM13*, codifica para coproporfirinogenio III oxidase) e de biossíntese de esterol (ex: *ERG11*, codifica para citocromo P450 lanosterol 14 α -demetilase) (ZITOMER e LOWRY, 1992; KWAST *et al.*, 1998). É relatado também que Hap1p está envolvida com as vias de síntese de proteínas e de utilização de açúcares, provavelmente por mecanismos indiretos causados pela não ativação dependente de Hap1p de um ou vários repressores. Por exemplo, Hap1p ativa a transcrição de Mth1p, um repressor de genes que codificam transportadores de hexoses (BECERRA *et al.*, 2002).

Além dos genes alvos citados, Hap1p ativa a transcrição do gene *ROX1* (*Regulation by Oxygen*), que codifica um repressor de genes expressos sob hipoxia, em condições aeróbias (KENG, 1992; DECKERT *et al.*, 1995b). Embora a função de Rox1p seja independente de heme, a expressão de *ROX1* é dependente, sendo mediada por heme via Hap1p (KENG, 1992).

A ligação de Rox1p à seqüência alvo não é suficiente para causar repressão dos genes hipóxicos (Tabela 1), sendo necessária a presença do complexo de repressão geral Tup1-Ssn6 (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 1993; DECKERT *et al.*, 1995a). Logo, quando a concentração de oxigênio é alta, Rox1p acumula-se na célula e reprime a transcrição de genes relacionados à hipoxia, juntamente com o complexo Tup1-Ssn6. Quando a concentração de oxigênio diminui, a expressão de *ROX1* não é induzida, Rox1p é rapidamente

degradada (ZITOMER *et al.*, 1997; MENNELLA *et al.*, 2003) e os genes relacionados à hipoxia são desreprimidos.

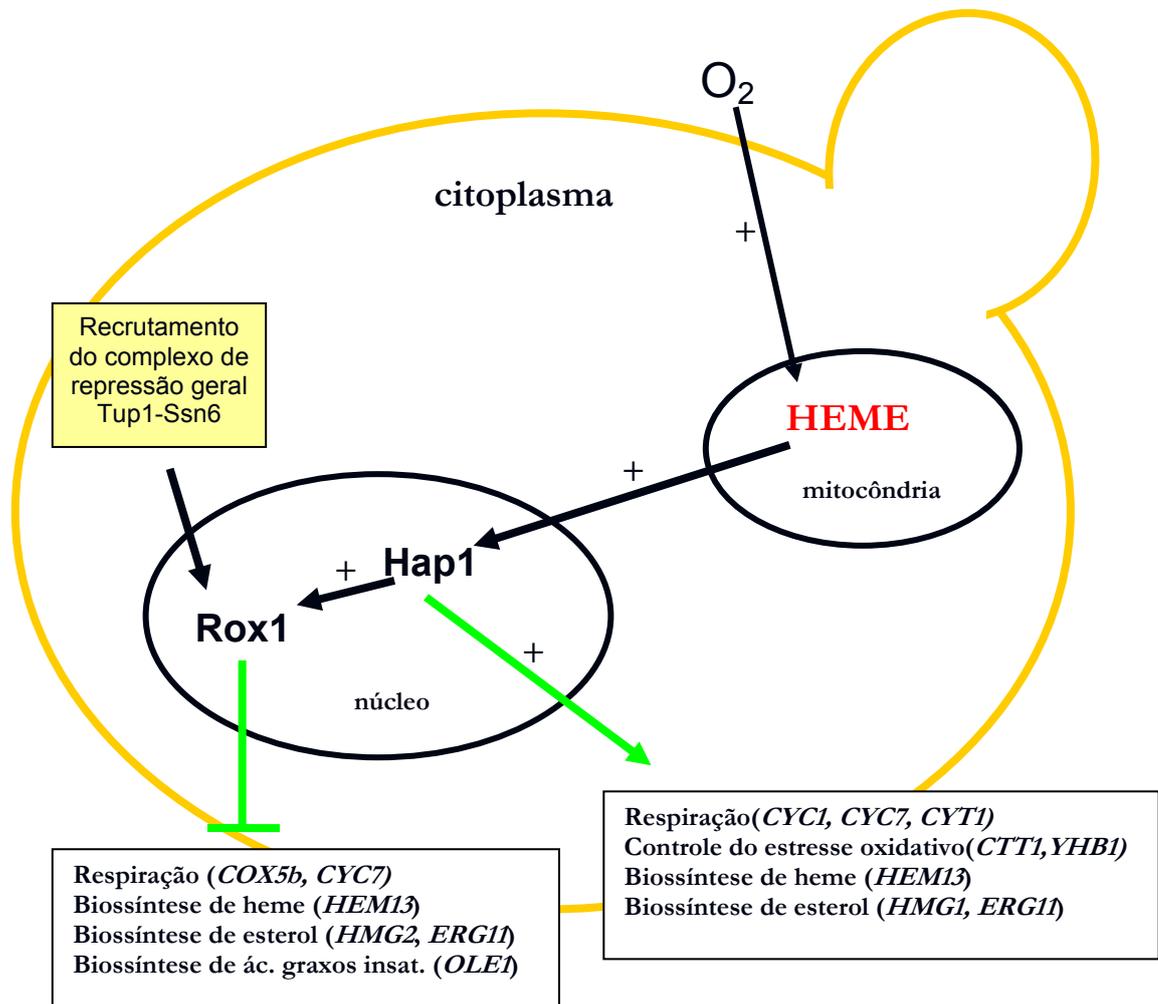


Figura 2: Modelo de regulação em resposta à variação de oxigênio molecular que envolve a molécula heme e os fatores de transcrição Hap1 e Rox1 em *S. cerevisiae*. Adaptado de ZHANG e HACH (1999).

Rox1p, em *S. cerevisiae*, reprime a transcrição de aproximadamente um terço dos genes expressos sob hipoxia (KWAIST *et al.*, 2002). É uma proteína que apresenta um domínio de ligação específico ao DNA e está inserida na classe SOX de proteínas HMG (DECKERT *et al.*, 1999); Rox1p se liga à seqüência consenso que consiste de 12 pb (YYYATTGTTCTC, em que Y é uma pirimidina) (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 1993, DECKERT *et al.*, 1999). Além do domínio HMG, Rox1p também contém um domínio rico em glutamina de função desconhecida e, um terceiro domínio de repressão, que medeia a repressão dos genes expressos sob hipoxia em conjunto com o complexo de

repressão geral Tup1-Ssn6 (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 1993; DECKERT *et al.*, 1995b; ZITOMER *et al.*, 1997).

A extensão da repressão por Rox1p varia e é alcançada pelas diferentes afinidades de Rox1p pelas sequências de reconhecimento presentes nos promotores de genes alvos. Entretanto, esse sistema de repressão também requer que níveis celulares de Rox1 sejam controlados, o que é alcançado pela auto-repressão de Rox1p (DECKERT *et al.*, 1995a; ZITOMER *et al.*, 1997). Além disso, promotores de alguns genes alvos (ex: *ANB1*) contêm sítios de ligação à Mot3p, um repressor geral que aumenta a repressão pelo complexo Rox1-Tup1-Ssn6 (KASTANIOTIS *et al.*, 2000a)

A maioria dos genes alvos de Rox1p (Tabela 1) codifica para proteínas que estão inseridas em vias cujas reações têm oxigênio como substrato, tais como biossíntese de heme (*HEM13*), esteróis (*ERG11*, *HMG2*, *CPR1*), ácidos graxos insaturados (*OLE1*); além de respiração (*AAC3*, *COX5b*, e *CYC7*), fator de tradução (*ANB1*) e fator de transcrição (*ROX1*). Com essa resposta, a célula aumentaria a eficiência de utilização do oxigênio e, ou ativaria vias alternativas quando houvesse uma condição limitante de oxigênio (KWAST *et al.*, 1998, 2002).

Estudos realizados com *S. cerevisiae*, referentes à regulação de genes que respondem à variação de concentração de oxigênio, constituem a base para o entendimento dessa regulação em *K. lactis*.

K. lactis é uma levedura comum em leite e derivados sendo capaz de assimilar lactose como única fonte de carbono e energia (WESOLOWSKI-LOUVEL *et al.*, 1994). Essa propriedade confere a *K. lactis* um potencial para a fermentação de lactose presente no permeado do soro de queijo, um resíduo gerado nas indústrias de laticínios (FLORES *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2005).

Interesses industriais associados a interesses científicos têm situado *K. lactis* como levedura modelo para estudos de fisiologia e regulação gênica de leveduras “não *Saccharomyces*” (FUKUHARA, 2006). *K. lactis*, como a maioria das leveduras na natureza, apresenta propriedades distintas da convencional e mais bem estudada levedura *S. cerevisiae*, que é reconhecida pela alta capacidade fermentativa, mas não é capaz de assimilar lactose (WESOLOWSKI-LOUVEL *et al.*, 1994).

Tabela 1: Sequências de reconhecimento para Rox1p.

Gene	Sequências de ligação à Rox1p	Função
<i>HEM13</i>	-476 TCA <u>ATTGTT</u> TAG -465 -238 TGC <u>TTTGTTC</u> AA -249 -185 CCC <u>ATTGTT</u> CTC -174	Metabolismo de Heme
<i>ERG11</i>	- 358 CCT <u>ATTGTGC</u> AT -347	Metabolismo de esteróis
<i>CPR1</i>	-95 TC <u>ATTGTT</u> CCT -84	
<i>HMG2</i>	-282 CGC <u>ATTGTTT</u> TG -271 -224 CTT <u>ATTGTT</u> CTC -235	
<i>SUT1</i>	-243 G <u>TTTTGTT</u> CCT -232 -342 AGC <u>TTTGTTC</u> TT -331	
<i>OLE1</i>	-272 CCT <u>ATTGTT</u> ACG -261	Metabolismo de ácido graxo insaturado
<i>COX5b</i>	-228 TGT <u>ATTGTT</u> CGA -217	Respiração
<i>CYC7</i>	-333 CCT <u>ATTGT</u> ATTA - 322	
<i>AAC3</i>	-197 TTC <u>ATTGTT</u> TGG -186 -145 TCC <u>ATTGTT</u> CCT -134	
<i>ANB1</i>	-316 TCC <u>ATTGTT</u> CGT -305 -285 CCT <u>ATTGTT</u> CTC -274 -218 TCC <u>ATTGTT</u> CTC -207 -197 CTC <u>ATTGTT</u> GCT -186	Fator de tradução
<i>ROX1</i>	-397 CCT <u>ATTGTT</u> GCT -386 -364 CGT <u>ATTGTC</u> TTG -353	Fator de transcrição
Sequência consenso	YYY<u>ATTGTT</u>CTC	

Fonte: Adaptado de KASTANIOTIS *et al.*(2000b)

S. cerevisiae e *K. lactis* são filogeneticamente próximas, entretanto, *K. lactis* possui metabolismo respiro-fermentativo mais dependente de concentrações de oxigênio, não crescendo em condições anóxicas. Ao contrário, *S. cerevisiae* exibe metabolismo predominantemente fermentativo em altas concentrações de glicose, mesmo em aerobiose (GONZÁLEZ-SISO *et al.*,

2000). Diferenças fisiológicas entre essas duas leveduras refletem a adaptação das mesmas em nichos ecológicos específicos, que em parte estão relacionadas à evolução de redes regulatórias específicas (BUSSEREAU *et al.*, 2006).

De acordo com os trabalhos de Bussereau *et al.* (2006), o alinhamento de sequências regulatórias de *S. cerevisiae* com as de *K. lactis* demonstrou que a grande maioria dos reguladores transcricionais presentes em *S. cerevisiae* parece também estar presente em *K. lactis*. Entretanto, é baixa a similaridade entre os reguladores, o que pode ser esperado considerando que os fatores de transcrição são alvos susceptíveis de pressões evolutivas. A conservação, porém, de alguns motivos justifica a identificação de sequências putativas que podem exercer a mesma função do regulador transcricional em organismos relacionados. Experimentos *in vivo* são necessários para comprovar as funções exercidas pelos potenciais reguladores de genes.

Lamas-Maceiras *et al.* (2007), ao estudarem a função de *K/Hap1p* em *K. lactis*, caracterizaram o gene *KIHAP1* e observaram que sua função não afetou o crescimento em meio contendo fontes de carbono fermentáveis (glicose) ou não fermentáveis (lactato, glicerol e etanol). Além disso, foi observado que a expressão transcricional de *K/Hap1p* é dependente da disponibilidade de oxigênio e ocorre em aerobiose, mas em hipoxia é aumentada. Quando analisadas em aerobiose a expressão de genes relacionados à respiração (*KIAAC3*, *KICOX5*, *KICYC1*, *KIQCR8*), biossíntese de ergosterol (*KIHMG*) e defesa ao estresse oxidativo (*KITSA1*, *KISOD2*), não foi notada a ativação dos mesmos por *K/Hap1p*, diferentemente do ocorrido para *ScHap1p*.

Outro estudo referente a *K/Hap1p* realizado por Bao *et al.* (2008) confirma o envolvimento de *K/Hap1p* como ativador transcricional do gene relacionado à respiração *KICYC1*, em resposta à variação de oxigênio molecular. Nesse mesmo trabalho foi observada maior produção de etanol em culturas *Klhap1Δ*, dado esse também reportado por Macêdo (2005). Essa maior produção de etanol foi explicada pela ação repressora de *K/Hap1p*, não havendo ainda explicação se de forma direta ou indireta, sobre o gene que codifica o transportador de glicose de baixa afinidade, *KIRAG1*. A combinação de uma ação negativa no fluxo glicolítico, por reduzir a entrada de açúcar, com uma ação positiva na expressão de algum gene relacionado à respiração

maximizaria a via respiratória, minimizando a fermentação em leveduras aeróbio-respiratórias como *K. lactis*.

Com o intuito de elucidar a função de *KIRox1p* em *K. lactis*, Macêdo (2005) identificou uma sequência putativa de *ROX1* apresentando em sua região promotora a sequência consenso de seis pares de bases (ATTGTT) e um possível sítio de ligação à Hap1p (CGGnnnTAnCGG). A sequência de aminoácidos apresentou 40% de identidade com a sequência de *S. cerevisiae* e ainda indicou um domínio HMG situado a partir do resíduo 281.

Uma linhagem *K. lactis* MW270-7B *rox1::URA3* foi construída por Macêdo (2005). Análise do metabolismo mostrou ser *K. lactis* MW270-7B *rox1Δ* mais fermentativa em relação à selvagem isogênica numa condição de cultivo em regime contínuo ($0,04 \text{ h}^{-1}$), condição essa de desrepressão por glicose, isto é, que favorece o metabolismo predominantemente oxidativo. Metabolismo mais fermentativo também foi detectado na transição de aerobiose para hipoxia para essa mesma linhagem mutante.

Em experimentos semelhantes aos de Macêdo (2005), incluindo uma taxa de diluição maior ($0,1 \text{ h}^{-1}$), foi novamente observado o metabolismo mais fermentativo da linhagem mutante mencionada, exceto na menor taxa de diluição em condição aeróbia (HARAMI, 2006). Da mesma forma, Colombo (2008), analisando outra linhagem, *K.lactis* MW270-7B *rox1::KanMX*, confirmou o metabolismo mais fermentativo observado por MACÊDO (2005) numa condição de regime contínuo com baixa taxa de diluição, $0,04 \text{ h}^{-1}$.

MERICO *et al.* (2007) analisaram a capacidade fermentativa de *K. lactis*, crescendo em glicose, sob condições aeróbias na presença de concentrações variadas de antimicina A, um inibidor da cadeia transportadora de elétrons (CTE), na reação da quinona para citocromo b. Os resultados mostraram que a dose máxima tolerada de antimicina A em meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) sólido foi de $5 \mu\text{M}$ (*S. cerevisiae* foi de $25 \mu\text{M}$), sendo observado crescimento em meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) sólido contendo $5 \mu\text{M}$ de antimicina A. O bloqueio da CTE por antimicina A em *K. lactis* MW270-7B *rox1Δ* pode subsidiar a hipótese da maior capacidade fermentativa dessa linhagem em relação à selvagem isogênica.

Considerando que as leveduras respondem à variação de oxigênio transcrevendo diferencialmente os genes dependentes de oxigênio (POYTON, 1999), estudos com objetivo de quantificar níveis de transcritos nas células

permitem avaliar as redes gênicas relacionadas ao fator de transcrição *K/Rox1* putativo regulado pelo oxigênio.

Numa análise de transcriptoma por micorarranjos, Blanco *et al.* (2007) observaram que os níveis de mRNA de *KIROX1* putativo não diminuíram em condição hipóxica, diferentemente do relatado em *S. cerevisiae* no trabalho de SERTIL *et al.* (2003). Entretanto, não se detectou o transcrito tanto em condições aeróbias quanto hipóxicas pela técnica de *Northern Blot*.

O fenótipo de um metabolismo mais fermentativo em *K. lactis* MW270-7B *rox1Δ* mostra uma ligação do fator de transcrição putativo *K/Rox1* com o metabolismo fermentativo, o que até então não foi comprovado para *S. cerevisiae*. Especula-se que ScRox1p tenha uma pequena função na formação de etanol, visto que expressão de *ADH1* e *ADH5* foram elevados em aerobiose em cepas *S. cerevisiae rox1Δ* crescidas em fonte de carbono galactose (KWAST *et al.*, 2002).

Esse fenótipo mais fermentativo e dados do transcriptoma motivam mais estudos para o melhor entendimento de *K/Rox1p* em *K. lactis*. E, sendo assim, este trabalho teve como objetivo estudar a influência de *K/Rox1p* no metabolismo fermentativo, em condições aeróbias e hipóxicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, ambos do Departamento de Microbiologia; e, no Laboratório de Infectologia Molecular Animal, do Departamento de Bioquímica. Todos os laboratórios estão instalados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Microrganismos utilizados

As linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 2. Os estoques foram mantidos a – 80 °C em meio YP (extrato de levedura 2 % (p/v), peptona 1 % (p/v)) acrescido de glicose 2 % (p/v) e glicerol 40 % (v/v).

Tabela 2: Linhagens de *Kluyveromyces lactis* utilizadas

Linhagens	Genótipo	Fonte
MW270-7B	<i>MATa uraA1-1, leu2, metA1-1</i>	Wésolowski-Louvel, M.
MW270-7B <i>rox1::KanMX</i>	<i>MATa uraA1-1, leu2, metA1-1</i> <i>klrox1::KanMX</i>	Bao, W.

3.2. Perfil de crescimento de *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ* em fontes de carbono fermentáveis e não fermentáveis

As linhagens *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ* foram cultivadas em batelada em meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) 0,67 % (p/v) acrescido das auxotrofias (metionina 0,002 % (p/v), uracila 0,002 % (p/v), leucina 0,006 % (p/v)) e 2 % (p/v) da fonte de carbono a ser avaliada, a 30 °C e 200 rpm em agitador *Incubator shaker – series 25D - New Brunswick*. O volume de trabalho foi de 30 mL em frascos de 125 mL e todo experimento foi realizado em triplicata.

As culturas foram iniciadas com uma absorbância a 600 nm de 0,15 quando fontes de carbono não fermentáveis etanol e glicerol foram usadas; enquanto, uma absorbância inicial de 0,1 foi utilizada quando fontes de carbono fermentáveis glicose e lactose foram testadas.

Amostras da cultura foram coletadas ao longo do tempo para leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm e tais leituras foram convertidas em valores logarítmicos neperianos. A velocidade específica de crescimento foi determinada a partir do coeficiente angular do melhor ajuste da regressão linear dos dados no gráfico (A_{600} x tempo) referentes à fase de crescimento exponencial das linhagens.

3.3. Capacidade fermentativa de *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ*

As linhagens *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ* foram cultivadas a 30 °C, 200 rpm (agitador New Brunswick) em meio YNB 0,67 % acrescido das auxotrofias (ver item 3.2) e 2 % (p/v) de glicose. As concentrações de antimicina A utilizadas foram 0,5 e 10 µM e a cultura foi iniciada com uma absorbância a 600 nm de 0,1. O volume de trabalho foi 20 mL em frascos de 100 mL.

Posteriormente, devida à dificuldade de leitura da densidade óptica pela formação de aglomerados celulares em meio contendo antimicina A, as mesmas linhagens foram cultivadas nas mesmas condições anteriores, mas em meio YP acrescido de glicose 2 % (p/v). O volume de trabalho foi de 14 mL em frascos de 50 mL e todo experimento foi realizado em triplicata.

As concentrações de antimicina A utilizadas foram 0, 10 e 20 µM e a cultura foi iniciada com uma absorbância a 600 nm de 0,1. Após 24 horas de

cultivo, o sobrenadante foi coletado para análise de etanol produzido e o sedimento celular foi coletado, lavado em água destilada e mantido a 105 °C até peso constante para determinação da biomassa celular seca.

3.4. Expressão gênica e metabolismo na transição aerobiose-hipoxia de *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ*

As linhagens *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ* foram cultivadas em meio YNB 0,67 % e glicose 1,5% (p/v), suplementado com as auxotrofias (ver item 3.2), bem como ergosterol 10 µg. mL⁻¹ e tween 80 0,1% (v/v) para proporcionar uma condição semelhante ao que se é geralmente utilizada para crescimento anaeróbico de *S. cerevisiae*.

O cultivo foi realizado em regime contínuo utilizando-se o biorreator BioFloIII (New Brunswick, USA). O volume de trabalho foi de 500 mL a uma temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm com injeção constante de ar (0,5 vvm) para proporcionar a aerobiose. Uma vez alcançado o estado permanente numa taxa de diluição de 0,1 h⁻¹, amostras foram coletadas para a avaliação do tempo zero referente à condição aeróbia. Posteriormente à coleta, o fluxo da cultura contínua foi desligado, a agitação diminuída para 100 rpm e a injeção de ar foi trocada pela injeção constante de nitrogênio gasoso ultrapuro a fim de proporcionar condições de hipoxia. Após 3, 6 e 9 horas sob hipoxia, amostras foram coletadas para serem analisadas.

Todas as amostras coletadas foram centrifugadas a 10000 g por 5 min. O sobrenadante foi estocado a – 20 °C para posterior análise dos substratos e produtos metabólicos. O sedimento foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a – 80 °C para posterior extração de RNA total e análise da expressão por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) quantitativo em Tempo Real, bem como para a atividade enzimática da álcool desidrogenase.

3.5. Análise do produto metabólico

O sobrenadante de todas as amostras foi descongelado e centrifugado a 10000 g por 5 min/ 4 °C. A concentração de etanol foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC, utilizando o detector de índice de refração modelo Hewlett Packard HP 1047A e a coluna Aminex HPX-87H da Bio-Rad. A temperatura de operação foi 60 °C e, o eluente, H₂SO₄ 0,005 M

com fluxo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A concentração de etanol foi medida mediante a comparação com os padrões externos preparados nas concentrações de 10 a 40 mM.

Para análise do produto metabólico referente ao experimento de capacidade fermentativa (item 3.3) e de transição aerobiose-hipoxia (item 3.4), o rendimento de etanol ($Y_{\text{etanol}/x}$) foi calculado dividindo-se a concentração de etanol produzida pela diferença da biomassa celular final e biomassa celular inicial.

Para análise do produto metabólico referente ao experimento de condição aeróbia em cultivo em estado permanente (item 3.4), o rendimento de etanol foi calculado dividindo-se a concentração de etanol produzida pela biomassa celular.

3.6. Determinação da atividade enzimática específica da álcool desidrogenase

O preparo do extrato celular dos sedimentos celulares coletados nos tempos 0, 3, 6 e 9 horas foi realizado de acordo com modificações no protocolo de BELLAVER *et al.* (2004) e PRIOR *et al.* (1996). O sedimento celular mantido a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foi descongelado a $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e ressuspensionado em $500 \mu\text{L}$ de tampão fosfato de potássio 10 mM pH $7,0$ para lavagem, com posterior centrifugação a 5441 g por 3 min . O sedimento foi então ressuspensionado em $700 \mu\text{L}$ do mesmo tampão e, em seguida, foi adicionado aproximadamente 360 mg de pérolas de vidro, além de MgCl_2 2 mM e Ditioneitol 1 mM .

A lise celular procedeu-se com 1 min sob agitação e 1 min a $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por cinco vezes. O extrato celular foi coletado após centrifugação 5441 g por 10 min .

O ensaio enzimático foi realizado segundo BLANDINO *et al.* (1997) imediatamente após o preparo dos extratos celulares.

Para cada tempo de cultivo a ser analisado, foram realizados três ensaios simultaneamente, um correspondente ao controle em que não foi adicionado o etanol, e dois correspondentes à reação completa. A mistura de reação consistiu de tampão Tris-HCl 250 mM pH $8,8$; NAD^+ $0,4 \text{ mM}$ e etanol 10% (v/v). A detecção de NADH foi obtida a 340 nm , 70 seg , $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo o coeficiente de extinção molar do NADH $6,22 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}$.

Uma unidade da atividade da álcool desidrogenase foi definida como a quantidade de enzima requerida para converter 1 μmol de NAD^+ a NADH por minuto.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se soro albumina bovina como padrão. Para o cálculo da atividade enzimática específica, foram utilizadas as equações citadas a seguir:

1. $dA/dt \text{ (min}^{-1}\text{)} = [\text{taxa}] \text{ experimental} - [\text{taxa}] \text{ controle}$

2. Atividade = $\frac{1000 \times VT \times D \times dA/dt}{\epsilon \times V \times CF}$, em que:

$$\epsilon \times V \times CF$$

VT = volume total na cubeta

D = diluição do extrato celular

V = volume do extrato celular usado

ϵ = coeficiente de extinção molar do NADH

CF = fator de concentração do extrato celular

3. Atividade específica = $\frac{\text{atividade}}{\text{concentração de proteínas totais}}$

3.7. Análise da expressão gênica

3.7.1. Extração de RNA total

O RNA total da biomassa obtida de cada amostra foi isolado segundo SCHMITT *et al.* (1990), com modificações.

O sedimento estocado a -80°C foi submetido à centrifugação por 12000 g e 4°C durante 5 min para retirada do excesso de sobrenadante. O sedimento de células foi, então, ressuspendido em $500\ \mu\text{L}$ de tampão AE (acetato de sódio $50\ \text{mM}$ pH 5,3 e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) $10\ \text{mM}$ pH 8,0) e $50\ \mu\text{L}$ de dodecil sulfato de sódio $10\ \%$ (p/v)). Um volume de fenol ácido foi adicionado à suspensão com posterior incubação a 70°C por uma hora e agitação vigorosa a cada 15 min. Após o período de incubação, amostras foram colocadas no gelo por 5 min e mantidas a -20°C por 10 min, seguido de posterior centrifugação a $12000\ \text{g}$ e 4°C durante 5 min. A fase

superior foi transferida para um novo microtubo. Em seguida, um volume de fenol ácido foi adicionado com posterior centrifugação a 12000 g e 4 °C durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para um outro microtubo e a ele foi adicionado um volume de clorofórmio seguido pela centrifugação a 12000 g e 4 °C durante 5 min.

Após a etapa de extração, o RNA total foi precipitado pela adição de 0,1 volume de uma solução de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e de 2,5 volumes de etanol absoluto. O RNA foi recuperado por centrifugação a 12000 g e 4 °C durante 5 min e posteriormente lavado com 1 mL de etanol 80 %. Uma vez parcialmente seco, prosseguiu-se a ressuspensão em 30 µL de água livre de nucelase.

A integridade do RNA total extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2 % em tampão TEB (Trizma base 54 g.L⁻¹, ácido bórico 27,5 g.L⁻¹, EDTA 0,5 M pH 8,0). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria a 260 nm e mantidas a – 80 °C.

Todas as amostras foram tratadas com *DNase RQ1- RNase Free* (Promega) utilizando-se 0.2 U para cada µg de RNA. A enzima foi inativada com a solução de parada, a 65 °C por 15 min. Posteriormente, foi realizada PCR para averiguar a contaminação por DNA genômico utilizando-se o gene constitutivo *KIACT1* de *K. lactis* como controle, o qual codifica para a actina. O programa utilizado foi: desnaturação a 94 °C por 1 min, seguido do número de 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min e 72 °C por 30 seg ; e, uma extensão final de 72 °C por 5 min.

3.7.2. Síntese de cDNA

A partir de 1 µg de RNA total previamente tratado com DNase livre de RNase, a síntese da primeira fita do cDNA foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante da *ImpromIITM Reverse Transcription System* (Promega). A reação de 20 µL consistiu de 1,0 µg de RNA total, 0,5 µg de oligonucleotídeos iniciadores aleatórios, mistura de dNTP's 0,5 mM, MgCl₂ 6,0 mM, 20 U inibidor recombinante RNAsin ribonuclease, tampão 1x Improm II, 1 µL transcriptase reversa Improm II.

Para confirmação da síntese de cDNA, Uma PCR foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores do gene constitutivo *KIACT1*. O cDNA foi mantido a - 20 °C.

3.7.3. Seleção e desenho de oligonucleotídeos iniciadores

Os genes selecionados para análise da expressão por Real Time PCR compreendem aqueles ortólogos em *Saccharomyces cerevisiae*. Entre eles enquadram-se os genes alvos putativos de *KIRox1p* em *K. lactis* (função;ORF): *KIAAC3* (transportador ADP/ATP mitocondrial; KLLA0E12353g), *KICOX5B* (possível citocromo *c* oxidase; KLLA0F03641g) e *KIHEM13* (coproporfirinogênio oxidase; KLLA0F18546g). Também foi selecionado o gene *KIHAP1* (proteína ativada por heme; KLLA0F22990g), que codifica fator de transcrição envolvido na regulação de genes aeróbios, bem como os genes *KIRAG1*, que codifica para o transportador de glicose de baixa afinidade (ORF: KLLA0D13310g) e *KIADH1* (ORF: KLLA0F21010g), que codifica para álcool desidrogenase I. As sequências dos genes descritos estão disponíveis no site <http://www.genolevures.org/klla.html>

KIACT1 (codifica para actina) foi utilizado como gene endógeno ou referência e está disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> com o número de acesso: AJ389081.

Oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 3) foram desenhados utilizando-se o programa *Primer Express 4.0* (Applied Biosystem). E, uma vez sintetizados, os oligonucleotídeos foram submetidos à PCR para verificar a especificidade da reação.

Tabela 3 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho

Gene	Sequência (5' – 3') oligonucleotídeo iniciador
<i>KIAAC3</i>	F: GATGGTGCCTTCGATGCTTT R: TGTTAGCACCACAACCCTTGA
<i>KICOX5B</i>	F: CAAGAAGACCAGTGCACGGTAA R: TAGCAAAGAGGCAATCAAACCA
<i>KIHEM13</i>	F: GAACTTGAGTCCACCTGCTATCAA R: CACCAGTTGCAGGATCAATAGG
<i>KIHAP1</i>	F: CACCTTCTCCAGCGCAGATT R: TGGAACTGCAGGCACTTTGTC
<i>KIRAG1</i>	F: GGTATCGCATGAAGAGGATTTGA R: TGTATTCCTTTGCTGGCTTTTG
<i>KIADH1</i>	F: TGTCTGTCACACCGATTTGC R: ACCTTCGTGACCACCAACTAA
<i>KIACT1</i>	F: CCAGAAGCTTTGTTCCATCCA R: ACCGGACATGACGATGTTACC

F: *forward*; R: *reverse*

3.7.4. Análise da região promotora

A pesquisa de sequências de reconhecimento por *K/Rox1p* dos genes selecionados no item 3.7.3 foi realizada utilizando-se o programa *Regulatory Sequence Analysis Tools* disponível em <http://embnet.ccg.unam.mx/rsa-tools/index.html>. A região analisada estendeu-se até - 800 pb a partir do códon ATG de cada gene, não permitindo sobreposição de ORFs *upstream*.

3.7.5. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em Tempo Real

PCR quantitativo em tempo real foi realizado no equipamento ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) em placas de 96 poços. Todas

as amostras foram avaliadas em triplicata. Cada reação (11 µL) continha: 7,0 µL Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 1 µL Rox Reference Dye (1:400), oligonucleotídeo iniciador *forward* 0,6 µM, oligonucleotídeo iniciador *reverse* 0,6 µM e 10 ng de cDNA.

Os parâmetros do ciclo utilizados foram: 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 seg; 60 °C por 30 seg.

O método utilizado para a análise dos dados foi quantificação relativa descrito por PFAFFL (2001). Esse método baseia-se na eficiência da PCR (E), bem como no *crossing point* (CP) de cada transcrito, que é o ponto em que a fluorescência aumenta apreciavelmente acima da fluorescência do ruído, também conhecido como *Cycle threshold* (Ct).

Para cada oligonucleotídeo iniciador, a eficiência da PCR (E) de um ciclo em fase exponencial foi calculada, utilizando-se 20, 10, 5 e 2,5 ng de cDNA diluído em série, de acordo com a equação citada a seguir:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

A razão da expressão relativa foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{CP}_{\text{alvo}} (\text{controle-amostra})}}{(E_{\text{referência}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}} (\text{controle - amostra})}}$$

Em que, E_{alvo} é a eficiência da PCR em tempo real do transcrito do gene alvo; $E_{\text{referência}}$ é a eficiência da PCR em tempo real do transcrito do gene *KIACT1*; $\Delta\text{CP}_{\text{alvo}}$ é a diferença do CP controle – CP da amostra do transcrito do gene alvo; $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ é a diferença do CP controle – CP da amostra do transcrito do gene *KIACT1*. O controle é interpretado como a amostra calibradora.

Os dados foram dispostos fazendo-se a comparação da expressão em aerobiose e hipoxia, fixando como ponto de referência o tempo 0 (aerobiose); e, fazendo-se a comparação da expressão entre a linhagem mutante *KIROX1* e a parental, fixando como ponto de referência cada tempo respectivo de uma cultura para outra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Perfil de crescimento de *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ* em fontes de carbono fermentáveis e não fermentáveis

Com o intuito de avaliar o perfil de crescimento de *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ* em fontes de carbono fermentáveis e não fermentáveis, as velocidades específicas de crescimento e a biomassa produzida após 24 horas foram determinadas nessas fontes e estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Velocidade específica de crescimento (μ) e biomassa (X) atingida após 24 horas de cultivo em batelada, em meio YNB adicionado de 2 % de fontes de carbono fermentáveis glicose ou lactose e não fermentáveis, etanol ou glicerol. Os resultados mostram a média aritmética \pm desvio padrão.

Fontes de carbono fermentáveis				
Célula	Glicose		Lactose	
	μ (h ⁻¹)	X (g. L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	X (g. L ⁻¹)
<i>Kl MW270-7B</i>	0,261 \pm 0,004 ^a	0,159 \pm 0,002 ^a	0,348 \pm 0,003 ^a	0,603 \pm 0,041 ^a
<i>Kl rox1Δ</i>	0,146 \pm 0,017 ^b	0,123 \pm 0,004 ^b	0,268 \pm 0,010 ^b	0,541 \pm 0,008 ^a

Fontes de carbono não fermentáveis				
Célula	Glicerol		Etanol	
	μ (h ⁻¹)	X (g.L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	X (g. L ⁻¹)
<i>Kl MW270-7B</i>	0,183 \pm 0,000 ^a	0,183 \pm 0,009 ^a	0,164 \pm 0,004 ^a	0,135 \pm 0,000 ^a
<i>Kl rox1Δ</i>	0,179 \pm 0,006 ^a	0,658 \pm 0,011 ^b	0,198 \pm 0,002 ^b	0,215 \pm 0,000 ^b

Na coluna, médias \pm desvio padrão elevados pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$)

Com a desrepressão de genes alvos de Rox1p em *S. cerevisiae*, a célula tenderia aumentar a eficiência de utilização de oxigênio (KWAST *et al.*, 1998, 2002). Sendo assim, esperar-se-ia um aumento no metabolismo respiratório com a deleção de *ROX1*.

O que se observa em *K. lactis* é que a deleção de *KIROX1*, em fontes de carbono fermentáveis glicose e lactose, tende a favorecer um metabolismo fermentativo considerando a menor velocidade específica de crescimento observada na Tabela 4, que normalmente é acompanhada por uma menor produção de biomassa uma vez que a fermentação gera um menor rendimento de ATP.

A maior produção de biomassa observada em fonte lactose, quando comparada à fonte glicose, reflete o maior poder energético dessa fonte, bem como a capacidade de *K. lactis* assimilar lactose como principal fonte de carbono e energia.

Em fontes de carbono não fermentáveis, glicerol e etanol, observa-se que a deleção de *KIROX1* favoreceu um metabolismo mais oxidativo.

Apesar de não se ter observado diferença significativa na velocidade específica de crescimento em glicerol, a biomassa produzida após 24 horas de cultivo foi 3,6 vezes maior na linhagem mutante. Essa maior diferença de biomassa em relação à linhagem controle pode ser devido ao estresse oxidativo que é possivelmente mais bem tolerado pela linhagem mutante.

Em etanol, a velocidade específica de crescimento da linhagem *K. lactis rox1Δ* bem como a biomassa foram maiores em relação à linhagem controle; o que sugere uma melhor utilização do etanol ou mesmo uma maior tolerância ao etanol. Esses mesmos dados também foram observados por Macêdo (2005) para uma linhagem *K. lactis MW270-7B rox1::URA3*.

Diante desses dados, observa-se que *K/Rox1p* não está apenas relacionada às variações de concentração de oxigênio no ambiente, mas também ao metabolismo de carbono fermentável ou não. De modo que, menor velocidade específica de crescimento de *K. lactis rox1Δ* em glicose, bem como menor produção de biomassa em glicose e lactose, em relação à linhagem selvagem, indicam que ausência de *K/Rox1p* pode favorecer um metabolismo fermentativo em fontes fermentáveis; por outro lado, maior produção de biomassa em glicerol e etanol, bem como maior velocidade específica de

crescimento em etanol, indicam que a ausência de *K/Rox1* favorece a respiração nessas fontes não fermentáveis.

4.2. Capacidade fermentativa de *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ*.

Para avaliar a capacidade fermentativa de *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ*, a respiração foi bloqueada pela adição de antimicina A.

Em meio YNB, não foi possível fazer uma avaliação mais quantitativa do crescimento das células na presença de antimicina A, uma vez que a adição da mesma causou a aglomeração das células e interferiu na leitura da absorbância. Pode-se apenas observar a diminuição do crescimento tanto da linhagem controle quanto mutante nas duas concentrações testadas de antimicina A (dados não mostrados). Foi relatado por Merico *et al.* (2007), o crescimento de *K. lactis* em meio YNB sólido com até 5 μ M de antimicina A, sendo assim, esperava-se observar maior resistência da linhagem mutante à antimicina A em concentrações maiores de 5 μ M, dada a hipótese da mesma possuir um metabolismo mais fermentativo.

Merico *et al.* (2007) sugeriram que a incapacidade de algumas espécies de leveduras crescerem na presença de antimicina A é principalmente devido ao balanço redox que é dificultado em meio mínimo pelo elevada quantidade de NADH gerada na biossíntese de aminoácidos. Para evitar essa incapacidade, o experimento foi então realizado utilizando-se meio YPD e a quantificação da biomassa foi realizada por massa seca para evitar erros na leitura de absorbância. Os resultados estão apresentados na Figura 3.

De acordo com os dados, a maior capacidade fermentativa da linhagem *K. lactis rox1Δ* pode ser observada com e sem adição de antimicina.

Na ausência de antimicina A, a linhagem mutante apresentou um rendimento de etanol por biomassa ($Y_{\text{etanol}/X}$) de 11,6 vezes maior do que o da linhagem controle.

O cultivo em 10 e 20 μ M de antimicina A aumentou a capacidade fermentativa das duas linhagens, porém, o $Y_{\text{etanol}/X}$ foi significativamente ($p > 0,05$) 1,29 e 1,19 vezes maior na linhagem mutante.

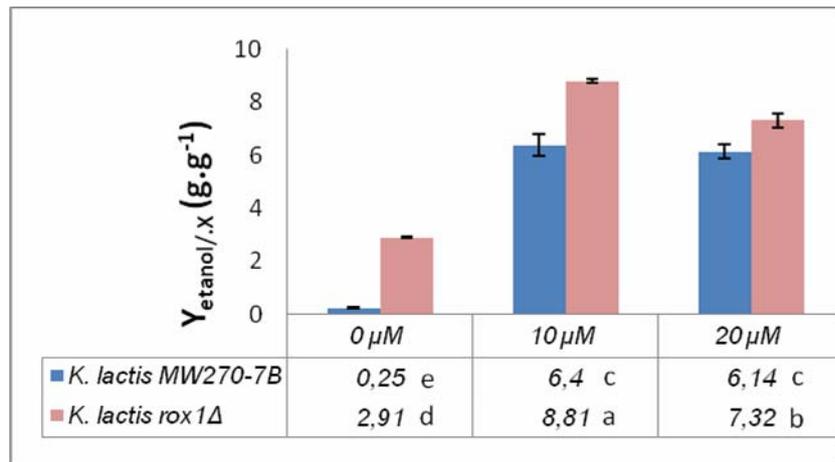


Figura 3: Rendimento de etanol por biomassa ($Y_{\text{etanol}/x}$) após 24 horas de cultivo em batelada, das linhagens *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis* rox1 Δ , em meio YP e 2% glicose, com antimicina A: 0 μ M, 10 μ M e 20 μ M. As barras em linha representam o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$).

Logo, os maiores valores de $Y_{\text{etanol}/x}$ observados na linhagem mutante rox1 Δ evidenciam a maior capacidade fermentativa da mesma e, assim, a influência de *K/Rox1p* no metabolismo fermentativo.

4.3. Expressão gênica e metabolismo durante transição aerobiose-hipoxia de *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis* rox1 Δ

4.3.1. Análise da região promotora

A expressão dos genes *KIADH1*, *KIHAP1*, *KIRAG1*, *KIAAC3*, *KICOX5B* e *KIHEM13* durante a transição aerobiose-hipoxia foi realizada com base na possibilidade dos mesmos serem alvos de *K/Rox1p*. Essa possibilidade foi verificada por uma pesquisa *in silico* pelas sequências de reconhecimento por *K/Rox1p* e está apresentada na Tabela 5.

As sequências de ligação à *K/Rox1p* encontradas para os genes em estudo diferiram em até dois nucleotídeos da sequência consenso YYYATTGTTCTC de *S. cerevisiae*, entretanto, esses dados não excluem a possibilidade de *K/Rox1p* se ligar as mesmas.

Tabela 5: Sequências putativas de reconhecimento por *K/Rox1p*.

Gene	Sequências putativas de reconhecimento por <i>K/Rox1p</i>	Fita
<i>KIAAC3*</i>	-150 TTCCTTGTTCTG -139	D
<i>KICOX5B*</i>	-183 TTCATGTTTCTC -172	R
	-744 TTTCTTGTTCTG -733	R
<i>KIHEM13</i>	-363 TCTATTTCTCTC -352	D
	-728 TTTATGATTCTC -717	R
<i>KIADH1</i>	- 273 TGTATTTTTCTC -262	D
	-583 TTTTTTGTTCTT -718	D
<i>KIHAP1</i>	-773 TCCAGTATTCTC -762	R
<i>KIRAG1</i>	-729 TTTCTTTTTCTC -762	R

*Dados obtidos também por *BLANCO et al. (2007)*; D: fita direta; R: fita reversa; caracteres em negrito indicam nucleotídeos que correspondem à sequência consenso **YYYATTGTTCTC**

4.3.2. Expressão dos possíveis genes alvos de *K/Rox1p*

Para avaliar a expressão de possíveis genes alvos de *K/Rox1p* em *K. lactis*, foram selecionados genes ortólogos a *AAC3*, *COX5B* e *HEM13* de *S. cerevisiae*, conhecidos por serem regulados por *ScRox1p*.

A Figura 4 apresenta a expressão em *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ* dos genes *KIAAC3*, *KICOX5B* e *KIHEM13* em relação ao tempo 0 hora (aerobiose).

Na linhagem *K. lactis* MW270-7B, a expressão dos genes em questão foi induzida em algum momento da condição hipóxica. Esses dados são semelhantes aos dos respectivos ortólogos *AAC3*, *COX5B* e *HEM13* em *S. cerevisiae*, que são referidos como genes hipóxicos e têm sua expressão elevada em condição limitante de oxigênio (*KWAST et al., 1998, 2002*).

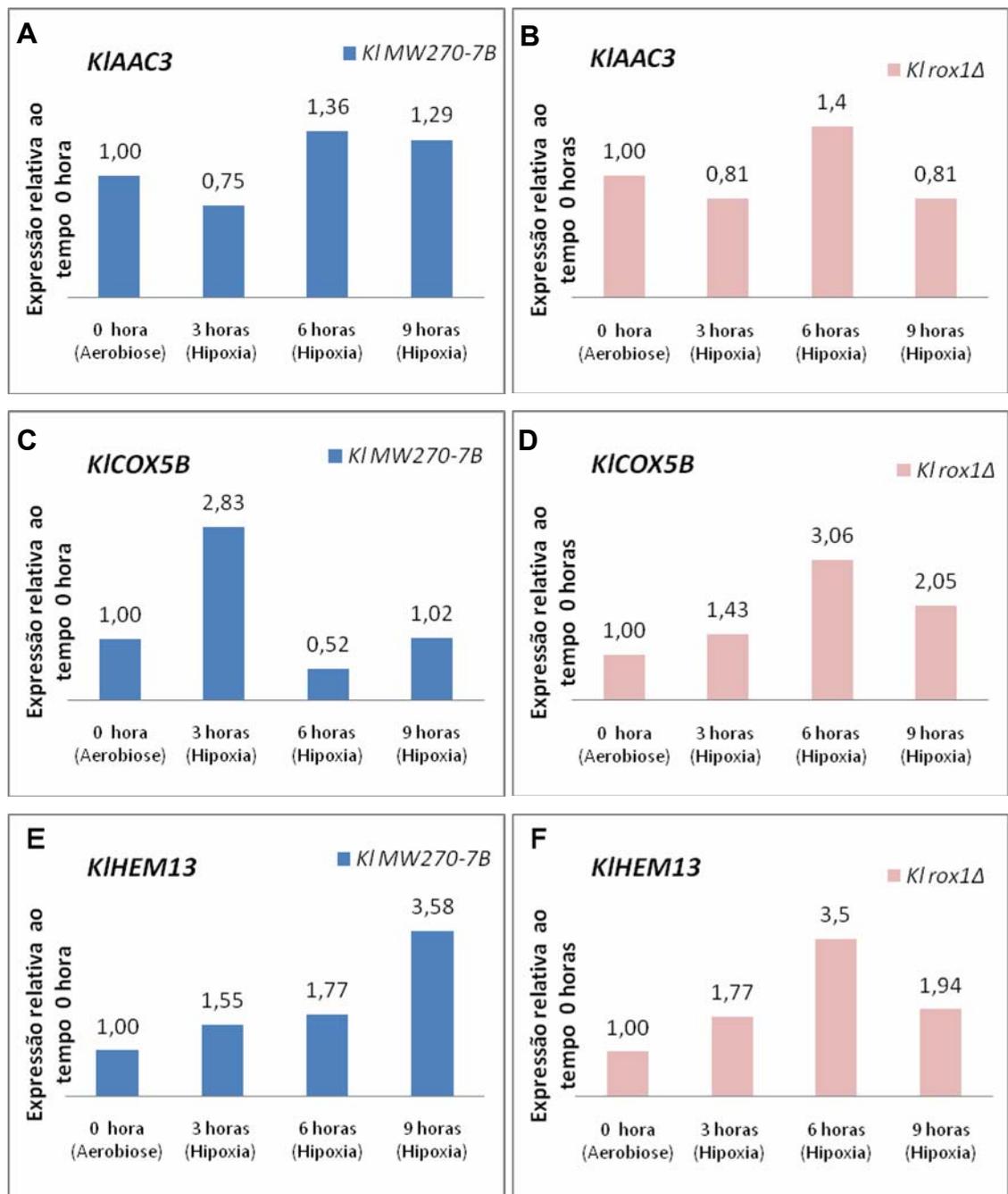


Figura 4: Expressão relativa ao tempo 0 hora de (A; B) *KIAAC3*, (C; D) *KICOX5B* e (E; F) *KIHEM1* em *K. lactis* MW270-7B (primeira coluna) e *K. lactis rox1Δ* (segunda coluna). Valores acima da barra indicam a razão da expressão.

Também é descrito na literatura para *K. lactis* que o gene *KIAAC3* foi expresso em condições aeróbias e teve aumento na expressão numa condição parcialmente anaeróbia (FONTANESI *et al.*, 2006). *KICOX5B*, pela técnica de microarranjos, foi expresso tanto em condições aeróbias quanto hipóxicas

(BLANCO *et al.*, 2007); enquanto *KIHEM13* também foi expresso em aerobiose e induzido em hipoxia (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2000).

Portanto, esses dados confirmam a presença de mecanismos de regulação transcricional por concentrações de oxigênio em *K. lactis* e a dependência do tempo na expressão de determinados genes, o que foi observado também por Blanco *et al.* (2007).

A indução de genes em hipoxia torna provável a existência de repressores que atuem em aerobiose e, que numa condição hipóxica, permitam a indução dos mesmos. Considerando os genes em estudo possíveis alvos de *KIRox1p*, este se torna um forte candidato para reprimi-los.

A análise da linhagem *K. lactis rox1Δ* para a expressão dos genes *KIAAC3*, *KICOX5B* e *KIHEM13* vem inferir o papel repressor de *KIRox1p* uma vez que a expressão dos mesmos em hipoxia é observada pelo menos em um dos tempos. E, assim como na linhagem controle, nota-se uma expressão dependente do tempo visualizada na Figura 4 (segunda coluna).

Entretanto, a comparação dos dados da expressão dos genes na condição aeróbia em relação à hipóxica, conforme assumida na Figura 4, permite apenas mensurar o quanto a expressão foi maior ou menor em relação à aerobiose em cada linhagem. Ela não permite mensurar o quanto a deleção de *KIROX1* afetou de fato a expressão. Sendo assim, fez-se necessária a comparação da expressão dos genes *KIAAC3*, *KICOX5B* e *KIHEM13* da linhagem mutante em função da linhagem controle. Os dados estão apresentados na figura 5.

A partir dos dados de expressão gênica relativa entre a linhagem mutante e a linhagem controle, observa-se que a ausência de *KIRox1p* ocasionou maior nível de transcrito *KIAAC3* e *KIHEM13*, tanto em aerobiose quanto em hipoxia. Esses dados, juntamente com a indução em hipoxia dos mesmos observada na linhagem controle, indicam que *KIRox1p* tem um efeito negativo sobre esses genes. No entanto, *KICOX5B* não pareceu ser influenciado por *KIRox1p*, apesar de se ter encontrado sequências de reconhecimento por *KIRox1p* no seu promotor.

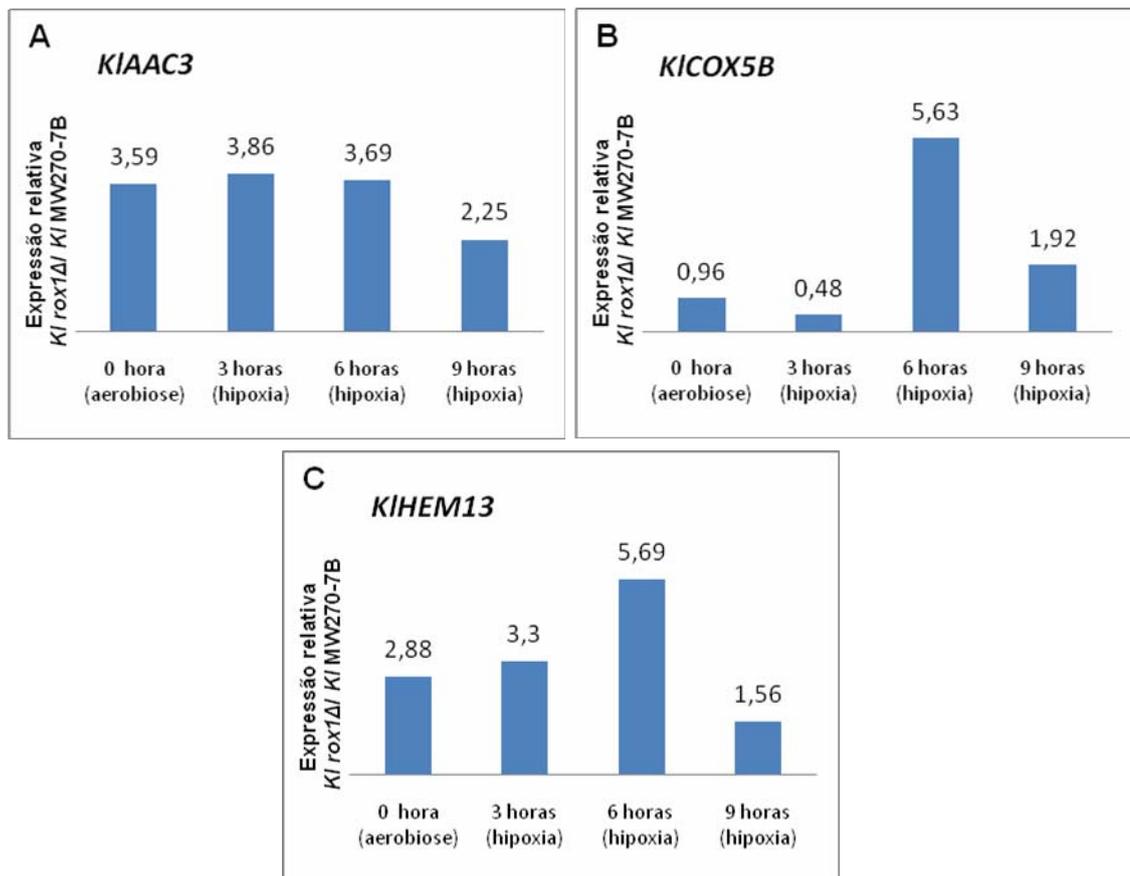


Figura 5: Expressão relativa *K. lactis rox1Δ/ K. lactis MW270-7B* dos genes **(A) KIAAC3**, **(B) KICOX5B** e **(C) KIHEM13**. Valores acima da barra indicam a razão da expressão.

Em condições limitantes de oxigênio, *KIAAC3* e *KIHEM13* são importantes para a manutenção do crescimento celular, uma vez que o primeiro codifica o transportador ADP/ ATP mitocondrial e, o segundo, participa da via de biossíntese de heme. A desrepressão desses genes por *K/Rox1p*, semelhantemente ao que ocorre em *S. cerevisiae*, tenderia a aumentar a utilização do oxigênio limitante.

4.3.3. Metabolismo e expressão gênica da álcool desidrogenase I (KIADH1)

O último passo da fermentação alcoólica é catalisado pela álcool desidrogenase (ADH) que reduz acetaldeído a etanol. Em cultivo de linhagens de *S. cerevisiae rox1Δ* em galactose como fonte de carbono, *ADH1* (codifica para a principal enzima fermentativa, ADH1p) e *ADH5* foram significativamente expressos em condição aeróbia e menos expressos em anaerobiose na linhagem selvagem, indicando um possível controle por ScRox1p na produção de etanol (KWAIST, 2002).

K. lactis apresenta quatro genes que codificam para ADH. *KIADH1p* e *KIADH2p* são isoenzimas citoplasmáticas, induzidas por glicose e têm a principal função na formação de etanol, enquanto *KIADH3p* e *KIADH4p* são mitocondriais (FLORES *et al.*, 2000; ZEEMAN *et al.*, 2000).

A análise do metabolismo por rendimento de etanol por biomassa e pela atividade da álcool desidrogenase durante a transição aerobiose-hipoxia (Figura 6A e 6B, respectivamente), bem como a análise da expressão de *KIADH1* (Figuras 6C e 7), visaram verificar a influência de *KIRox1p* no metabolismo fermentativo durante essa transição.

A partir do rendimento de etanol por biomassa ($Y_{\text{etanol/x}}$) apresentado na Figura 6A, nota-se que em estado permanente aeróbio, a produção de etanol foi 1,8 vezes maior na linhagem mutante quando comparada à linhagem controle. Além disso, um crescente aumento na produção de etanol pode ser observado na condição hipóxica por ambas as linhagens. Entretanto, foi de 2,45, 2,87 e 3,72 vezes maior nos tempos 3, 6 e 9 horas, respectivamente, pela linhagem mutante.

Metabolismo mais fermentativo da linhagem *K. lactis rox1Δ*, tanto na condição aeróbia quanto hipóxica, pode ser verificado também pelos dados de atividade enzimática da ADH apresentados na Figura 4B.

Quando analisadas as atividades ADH das linhagens controle e mutante, não se observa um aumento significativo ($p \geq 0,05$) na atividade do tempo 0 ao 9, exceto no tempo 3 e 9, respectivamente. Entretanto, quando comparadas as atividades ADH de ambas as linhagens de uma maneira geral, observa-se uma maior atividade ADH significativa ($p \geq 0,05$) da linhagem mutante.

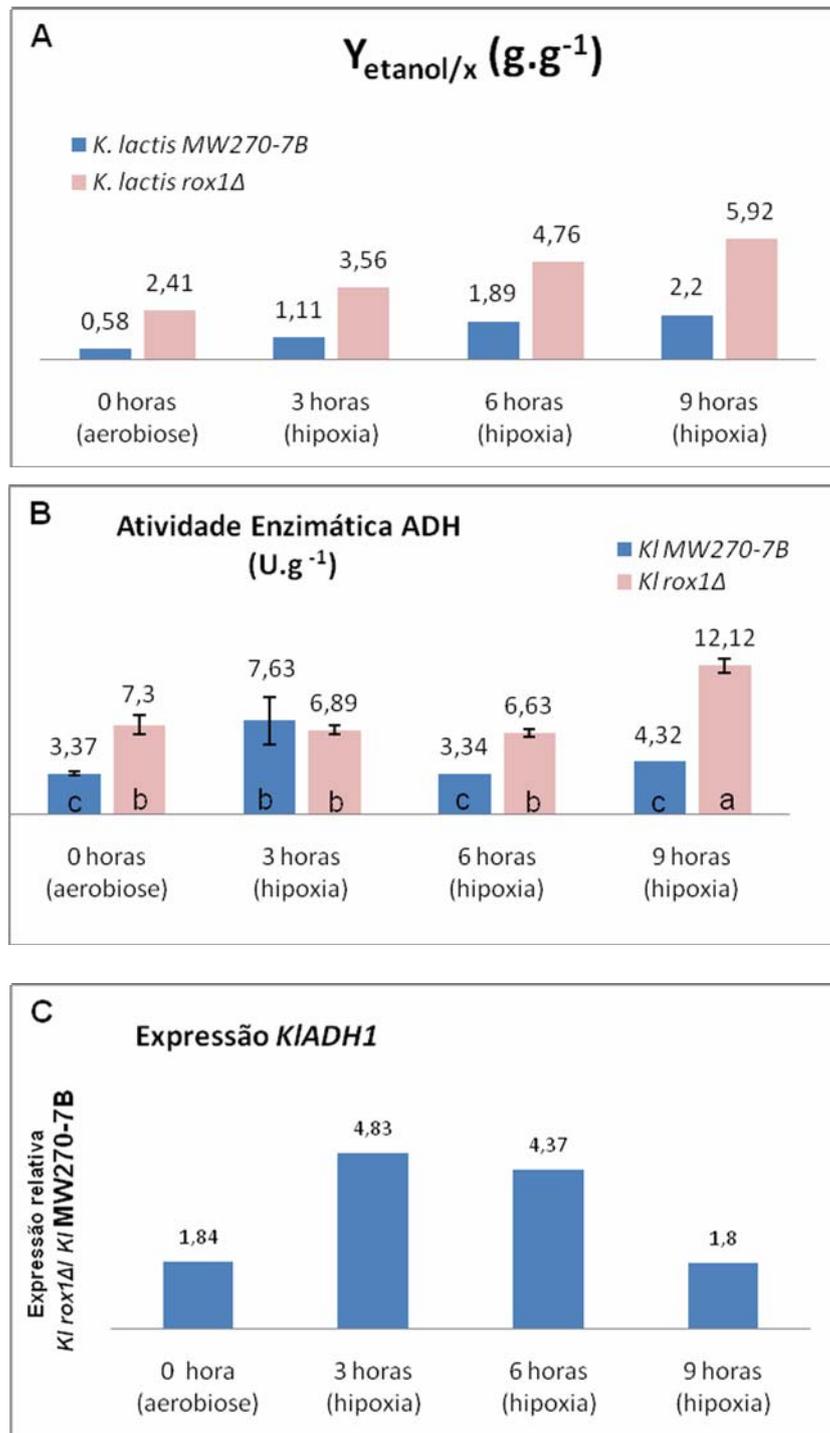


Figura 6: (A) Rendimento de etanol por biomassa ($Y_{\text{etanol}/x}$). (B) Atividade enzimática da álcool desidrogenase (ADH); barras em linha representam o desvio padrão; valores acima da barra indicam a média; letras iguais indicam médias que não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$). (C) Expressão relativa *K. lactis* rox1Δ/ *K. lactis* MW270-7B de *KIADH1*. Valores acima da barra indicam a razão da expressão.

O maior $Y_{\text{etanol}/x}$ e a maior atividade da ADH observados com a deleção de *KIROX1* podem ser confirmados pela maior expressão relativa *K. lactis rox1Δ*/ *K. lactis* MW270-7B de *KIADH1*, tanto em aerobiose quanto hipoxia, observada na figura 6C. A não correspondência no tempo 9 horas da expressão relativa com a atividade da ADH pode ser explicada pelo fato da última ser resultante da atividade de um conjunto de *KIADHp* e, não apenas de *KIADH1p*.

A expressão relativa ao tempo 0 hora de *KIADH1* em *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ* está apresentada na Figura 7 e mostra que o perfil de expressão foi semelhante para ambas as linhagens, exceto para uma indução em 9 horas para a linhagem controle.

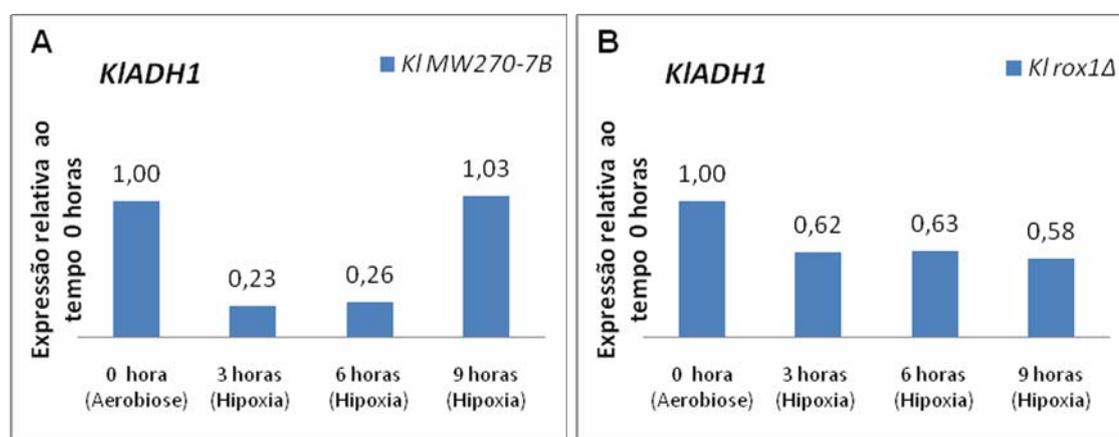


Figura 7: Expressão relativa ao tempo 0 hora (aerobiose) de *KIADH1* em **(A)** *K. lactis* MW270-7B e **(B)** *K. lactis rox1Δ*. Valores acima da barra indicam a razão da expressão.

Os dados de expressão relativa ao tempo 0 hora de *KIADH1* na linhagem controle e mutante não estão em concordância ao observado para o rendimento de etanol em hipoxia apresentado na Figura 6A. Isso dificulta avaliar se *KIRox1p* atua como repressor de *KIADH1* sob hipoxia, entretanto, a maior expressão relativa de *KIADH1* na ausência de *KIRox1p* como apresentado na figura 6C mostra que *KIRox1p* atua de alguma maneira sobre *KIADH1*.

Logo, todos esses dados evidenciam a influência negativa de *KIRox1p* no metabolismo fermentativo. E, uma vez que leveduras *K. lactis rox1Δ* tem um

potencial fermentativo, sugere-se sua aplicação na produção de etanol a partir de soro residual da indústria de queijo.

4.3.4. Expressão de genes que codificam o fator de transcrição (*KIHAP1*) e o transportador de glicose de baixa afinidade (*KIRAG1*)

Em *K. lactis*, é relatado que *KIHap1p* tem um efeito repressor sobre *KIRAG1* (codifica transportador de glicose de baixa afinidade), o que ocasiona a diminuição da fermentação e favorece o metabolismo aeróbio-respiratório de *K. lactis* (BAO *et al.*, 2008). Por não ser conhecido se esse efeito é direto ou indireto, pode-se supor que *KIRox1p* tenha algum envolvimento uma vez que cepas *K. lactis rox1Δ* apresentam metabolismo mais fermentativo. Sendo assim, a avaliação da expressão gênica de *KIHAP1* e *KIRAG1* em *K. lactis rox1Δ* poderia levar a uma maior compreensão do papel de *KIRox1p* no metabolismo fermentativo.

A Figura 8 apresenta a expressão dos genes *KIRAG1* e *KIHAP1* em *K. lactis* MW270-7B e *K. lactis rox1Δ* em relação ao tempo 0 hora (aerobiose).

Analisando a linhagem controle, *KIHAP1* teve a expressão induzida em condição hipóxica, dado que também foi observado por BAO *et al.* (2008). Nenhum referencial se tem a respeito da expressão de *KIRAG1* em aerobiose e hipoxia, o que é evidenciado na Figura 8C é que sua expressão é diminuída em condição hipóxica, possivelmente pelo aumento da expressão de *KIHAP1*. O mesmo perfil de expressão de *KIHAP1* e *KIRAG1* da linhagem controle pode ser observado para a linhagem mutante, não evidenciando assim um efeito de *KIRox1p* sobre os mesmos.

Entretanto, ao se avaliar a expressão relativa da linhagem mutante/controlado, pode-se mensurar o quanto a ausência de *KIRox1p* afetou a expressão de *KIHAP1* e *KIRAG1*. Os dados apresentados na Figura 9 mostram que a deleção de *KIROX1* aumentou os níveis dos transcritos dos genes *KIHAP1* e *KIRAG1* em aerobiose e hipoxia, o que indica que *KIRox1p* influencia a expressão dos mesmos.

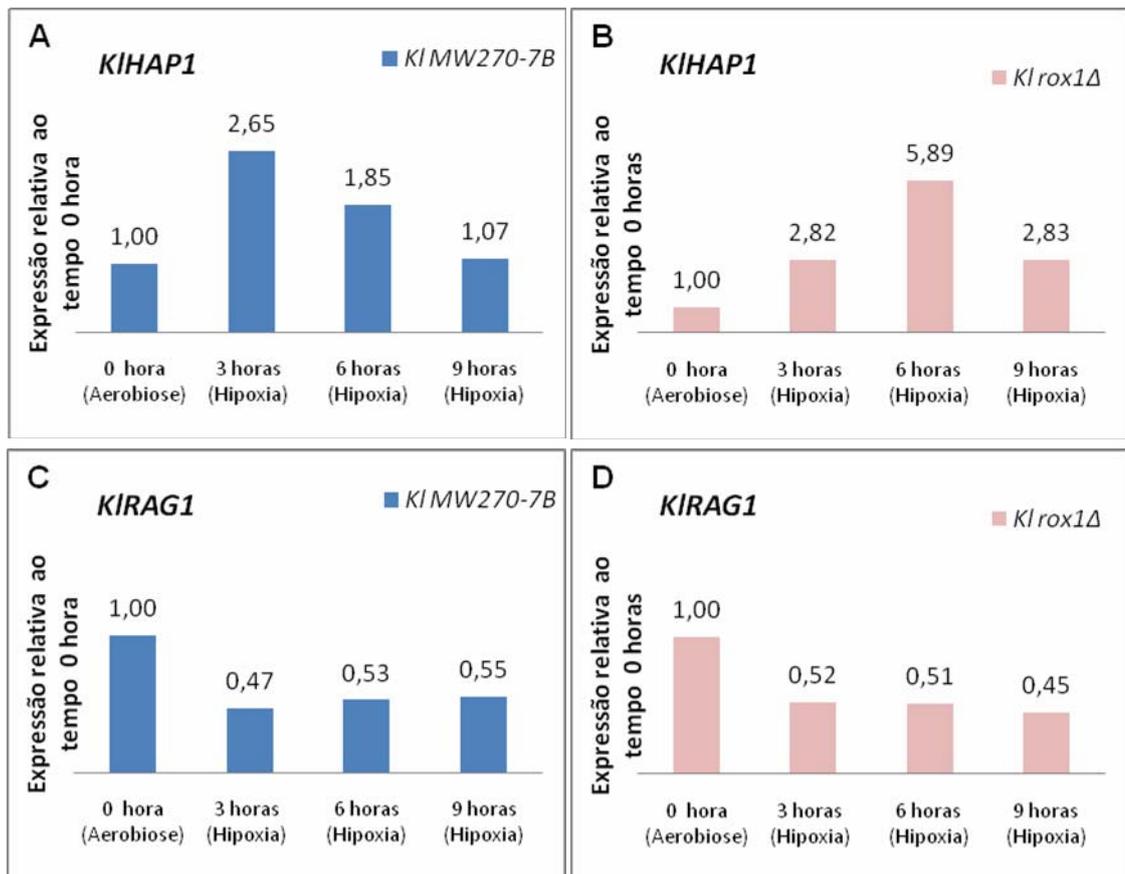


Figura 8: Expressão relativa ao tempo 0 hora de **(A; B)** *KIHAP1* e **(C; D)** *KIRAG1* em *K. lactis* MW270-7B (primeira coluna) e *K. lactis rox1Δ* (segunda coluna). Valores acima da barra indicam a razão da expressão.

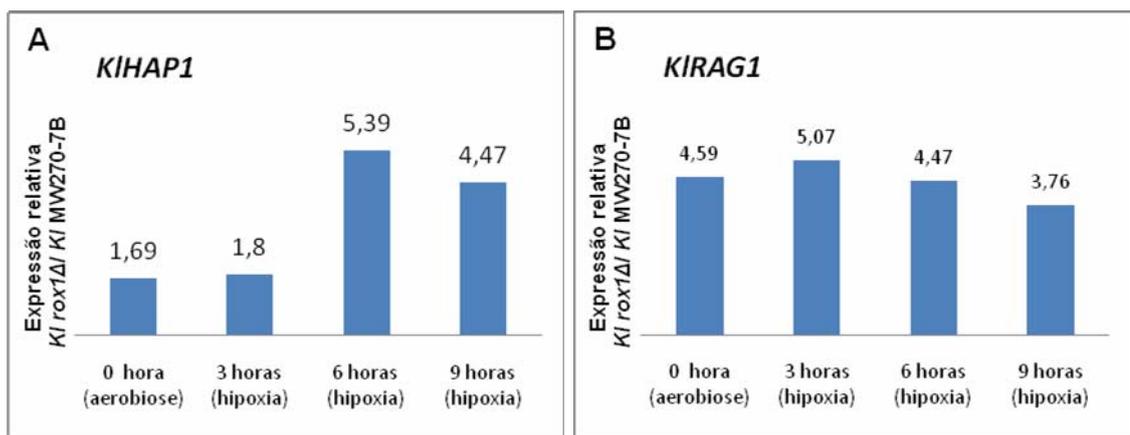


Figura 9: Expressão relativa *K. lactis rox1Δ/ K. lactis* MW270-7B dos genes **(A)** *KIHAP1* e **(B)** *KIRAG1*. Valores acima da barra indicam a razão da expressão.

Como mencionado, *KIHAP1* tem um efeito repressor sobre *KIRAG1* e, a expressão relativa entre esses dois genes na linhagem controle e mutante (Figura 10), separadamente, mostra a expressão diferencial existente para cada linhagem e que está coerente com a regulação observada por BAO *et al.* (2008).

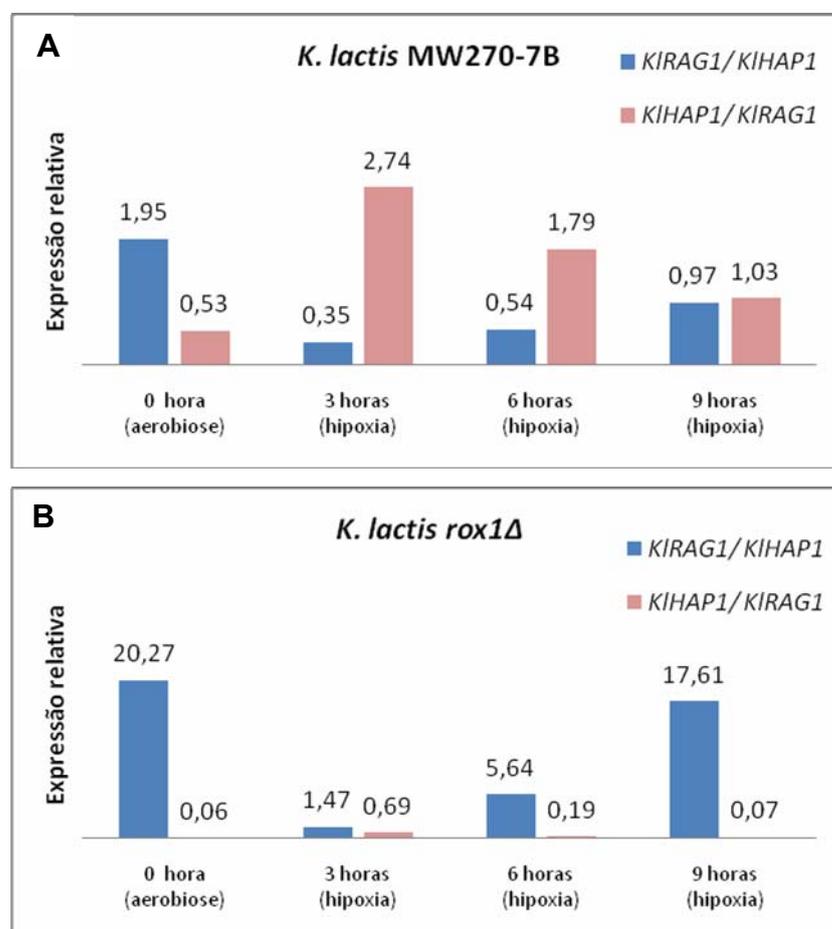


Figura 10: Expressão relativa de *KIHAP1* e *KIRAG1* nas linhagens **(A)** *K. lactis* MW270-7B e **(B)** *K. lactis* *rox1Δ*. Valores acima da barra indicam a razão da expressão.

KIHAP1 é, de fato, mais expresso na linhagem mutante (Figura 9A), assim como *KIRAG1* (Figura 9B), porém, quando é feita a relação de um gene em função de outro dentro da mesma linhagem, ele se torna proporcional de acordo com sua expressão (Figura 10).

A maior expressão de *KIRAG1* na linhagem mutante observada justifica o maior fluxo glicolítico em relação à linhagem controle para suportar o

metabolismo mais fermentativo e, assim, a maior produção de etanol pela mesma, bem como uma maior atividade da ADH encontrada.

Logo, todos esses dados indicam que *KIRox1p* está envolvido de alguma maneira nessa regulação, atuando sobre *KIHAP1* e *KIRAG1*.

5. CONCLUSÃO

As conclusões deste trabalho são:

- A ausência de *KIROX1* não favorece o crescimento de *K. lactis* em fontes de carbono fermentáveis (glicose ou lactose), mas favorece em fontes de carbono não fermentáveis (etanol ou glicerol).
- A linhagem *K. lactis* MW270-7B *rox1*Δ exibe maior capacidade fermentativa que a linhagem controle *K. lactis* MW270-7B quando cultivada em meio YP adicionado de glicose, na ausência e presença de 10 e 20 μM de antimicina A.
- Os genes *KIAAC3*, *KICOX5B*, *KIHEM13*, *KIADH1*, *KIHAP1* e *KIRAG1* apresentam na sua região promotora a sequência consenso *YYYATTGTCTC*, diferindo em dois nucleotídeos.
- A linhagem *K. lactis rox1*Δ, quando cultivada em aerobiose sob regime contínuo ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$) e, posteriormente imposta a uma condição de hipoxia por 9 horas, apresenta, nas duas condições, maior rendimento de etanol por biomassa, maior atividade de ADH e maior expressão relativa *K. lactis rox1*Δ/ *K. lactis* MW270-7B de *KIADH1* que a linhagem controle cultivada nas mesmas condições; confirmando o metabolismo mais fermentativo da linhagem mutante e sugerindo sua aplicação na produção de etanol a partir de soro residual da indústria de queijo.

- *KIRox1p* tem efeito negativo sobre a expressão de *KIAAC3* e *KIHEM13*.

- Expressão de *KICOX5B* não parece ser influenciada por *KIRox1p*.

- *KIRox1p* atua sobre a expressão de *KIHAP1* e *KIRAG1*.

- As maiores expressões em aerobiose e hipoxia de *KIADH1*, *KIHAP1* e *KIRAG1* na ausência de *KIROX1*, sugere a influência de *KIRox1p* no controle em pontos chaves do metabolismo fermentativo, isto é, na entrada da glicose, que determina o fluxo que garante a via fermentativa, e na reação redutiva final, que culmina com a formação de etanol.

- A existência de genes que são negativamente regulados por *KIRox1p* em aerobiose, como *KIAAC3* e *KIHEM13*, indicam a existência em *K. lactis* de mecanismo de regulação transcricional por oxigênio que visam melhor utilizar o oxigênio numa condição limitante, semelhante ao papel de *ScRox1p*. Esse mecanismo parece não estar relacionado apenas com as concentrações de oxigênio, mas também com metabolismo de carbono fermentável ou não fermentável.

- Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, o modelo de regulação em *K. lactis* incluiria o efeito da fonte de carbono, como sugerido na Figura 11. Nesse modelo, *KIRox1p* tem sua função exercida numa via dependente de concentração de oxigênio, de modo que a presença de oxigênio culmina com a ativação de *KIHap1p*, esta possivelmente ativa a transcrição de *KIRox1p* para que genes como *KIAAC3*, *KIHEM13*, *KIADH1* e *KIRAG1* sejam reprimidos. O metabolismo de carbono fermentável ou não fermentável estaria, de maneira não conhecida e dependente ou não da concentração de oxigênio, atuando também na regulação de *KIRox1p*.

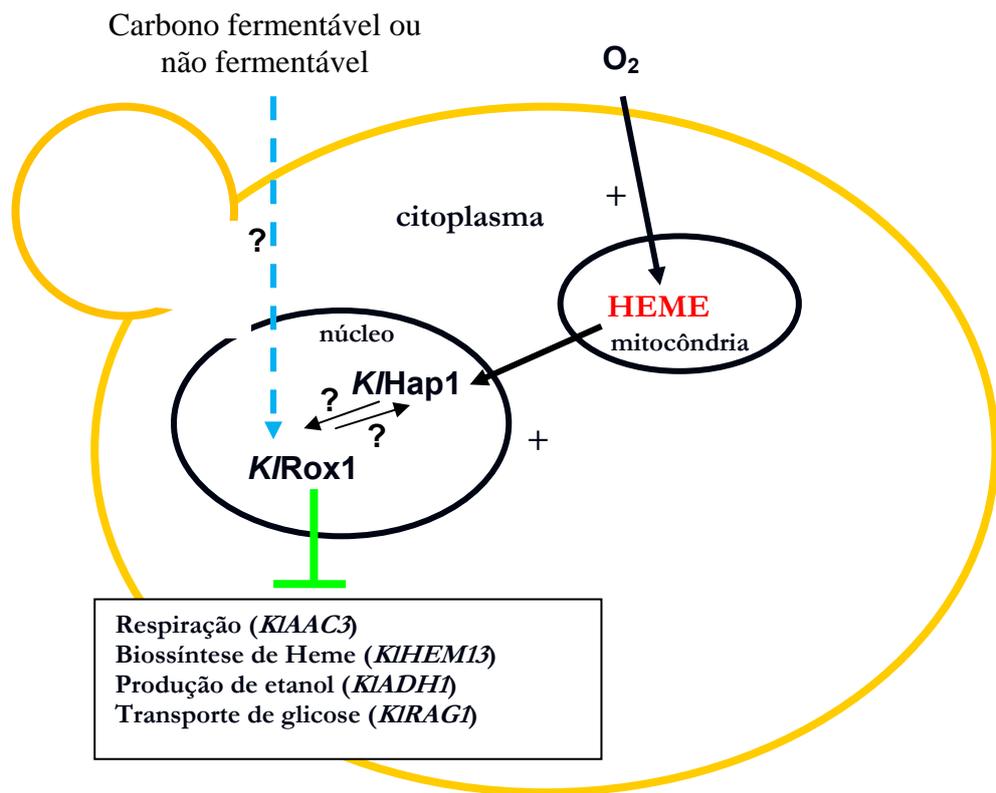


Figura 11 – Modelo de regulação do metabolismo de *K. lactis* por *K/Rox1p* dependente de oxigênio e fonte de carbono.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALASUBRAMANIAN, B.; LOWRY, C. V.; ZITOMER, R. S. The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a High-Mobility-Group Motif. **Molecular and Cellular Biology**, 13(10): 6071-6078, 1993.

BAO, W-G.; GUIARD, B.; FANG, Z-A.; DONNINI, C.; GERVAIS, M.; PASSOS, F. M. L.; FERRERO, I.; FUKUHARA, H. Oxygen-dependent transcriptional regulator Hap1p limits glucose uptake by repressing the expression of the major glucose transporter gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. **Eukaryotic Cell** 7: 1895-1905, 2008.

BÄR, D.; GOLBIK, R.; HÜBNER, G.; LILIE, H.; MÜLLER, E-V.; NAUMANN, M.; OTTO, A.; REUTER, R.; BREUNING, K.; KRIEGEL, T.M. The unique hexokinase of *Kluyveromyces lactis*. **The Journal of Biological Chemistry**, 278 (41): 39280-39286, 2003.

BECERRA, M.; LOMBARDÍA-FERREIRA, L. J.; HAUSER, N. C.; HOHEISEL, J. D.; TIZON, B.; CERDÁN, E. The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of *hap1*, *rox1*, *rox3* and *srb10* deletions. **Molecular Microbiology**. 43 (3): 545-555, 2002.

BELLAVER, L. H.; CARVALHO, N. M. B.; ABRAHÃO-NETO, J. ; GOMBERT, A. K. Ethanol Formation and Enzyme Activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**, 4, 691-698, 2004.

BELO, E. V. C. Efeitos da deleção do gene *ROX1* na produção de biomassa e fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae*. **Monografia**. Universidade Federal de Viçosa, 2008.

BLANCO, M.; NÚÑEZ, L.; TARRÍO, N.; CANTO, E.; BECERRA, M.; GONZÁLEZ-SISO, M. I.; CERDÁN, M. E. An approach to the hypoxic and oxidative stress responses in *Kluyveromyces lactis* by analysis of mRNA levels. **FEMS Yeast Research**, 7(5): 702-714, 2007.

BLANDINO, A.; CARO, I.; CANTERO, D. Comparative study of alcohol dehydrogenase activity in flor yeast extracts. **Biotechnology Letters**, 19 (7), 651-654, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Analytical Biochemistry**, 77, 248-254, 1976.

BURKE, P. V.; RAITT, D. C.; ALLEN, L. A.; KELLOGG, E. A.; POYTON, R. O. Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase genes in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, 272(23): 14705-14712, 1997.

BUSSEREAU, F.; CASAREGOLA, S.; LAFAY, J-F.; BOLOTIN-FUKUHARA, M. The *Kluyveromyces lactis* repertoire of transcriptional regulators. **FEMS Yeast Research**, 6: 325-335, 2006.

COLOMBO, L. T. Caracterização de um fenótipo da linhagem *Kluyveromyces lactis rox1Δ* em cultura contínua sob limitação por carbono. **Monografia**. Universidade Federal de Viçosa, 2008.

DE DEKEN, R. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. **Journal of General Microbiology**, 44:149-156, 1966.

DECKERT, J.; KHALAF, R. A.; HWANG, S. M.; ZITOMER, R. S. Characterization of the DNA binding and bending HMG domain of the yeast hypoxic repressor Rox1. **Nucleic Acids Research**, 27(17): 3518-3526, 1999.

DECKERT, J.; PERINI, R.; BALASUBAMANIAN, B.; ZITOMER, R. S. Multiple elements and auto-repression regulate Rox1, a repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 139: 1149-1158, 1995a.

DECKERT, J.; RODRIGUEZ-TORRES, A. M.; SIMON, J. T.; ZITOMER, R. S. Mutational analysis of Rox1, a DNA-bending repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, 15(11): 6109-6117, 1995b.

FLORES,C-L.; RODRÍGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews** 24: 507-529, 2000.

FONTANESI, F.; VIOLA, A. M.; FERRERO, T. Heterologous complementation on the *Klaac* null mutation of *Kluyveromyces lactis* by the *Saccharomyces cerevisiae* AAC3 gene encoding the ADP/ ATP carrier. **FEMS Yeast Research**, 6: 414-420, 2006.

FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis* – a retrospective. **FEMS Yeast Research**, 6: 323-324, 2006.

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, M.; FREIRE-PICOS, M. A.; RAMIL, E.; GUIARD, B.; CERDÁN, M. E. Heme-mediated transcriptional control in *Kluyveromyces lactis*. **Current Genetics**, 38: 171-177, 2000.

GONZÁLEZ-SISO, M. I.; FREIRE-PICOS, M. A.; RAMIL, E.; GONZÁLEZ-DOMINGUES, M.; TORRES, A. R.; CERDÁN, M. E. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. **Enzyme and Microbial Technology**, 26: 699-705, 2000.

HARAMI, T. Análise do metabolismo de culturas *kluveromyces lactis rox1Δ* em regime contínuo aeróbio e, na transição de aerobiose para hipoxia, em batelada. **Monografia**. Universidade Federal de Viçosa, 2006.

HON, T.; DOD, A.; DIRMEIERS, R.; GORMAN, N.; SINCLAIR, P. R.; ZHANG, L.; POYTON, R. O. A Mechanism of oxygen sensing in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, 278 (50): 50771-50780, 2003.

KASTANIOTIS, A. J.; MENNELLA, T. A.; KONRAD, C.; TORRES, A. M. R.; ZITOMER, R. S. Roles of transcription factor Mot3 and chromatin in repression of the hypoxic gene *ANB1* In yeast. **Molecular and Cellular Biology**, 20 (19): 7088-7098, 2000a.

KASTANIOTIS, A. J.; ZITOMER, R. S. Rox1 mediated repression. Oxygen dependent repression in yeast. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 475: 185-195, 2000b.

KENG, T. HAP1 and ROX1 form a regulatory pathway in the repression of *HEM13* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, 12 (6): 2616-2623, 1992.

KWAST, K. E.; LAI L-C., MENDA, N.; JAMES III, D. T.; AREF, S., BURKE, P.. Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. **Journal of Bacteriology**, 184: 250-265, 2002.

KWAST, K. E.; BURKE, P. V.; POYTON, R.O. Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. **The Journal of Experimental Biology**, 201: 1177-1195, 1998.

LAMAS-MACEIRAS, M.; NÚÑEZ, L.; RODRÍGUEZ-BELMONTE, E.; GONZÁLEZ-SISO, M. I.; CERDÁN, M. E. Functional characterization of *KIHAP1*: a model to foresee different mechanisms of transcriptional regulation by Hap1p in yeasts. **Gene**. 405:96-107, 2007.

MACÊDO, C.S. Caracterização fisiológica de mutantes *Kluyveromyces lactis* *hap1* e *rox1* sob aerobiose e hipoxia. **Tese** (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 2005.

MENNELLA, T. A.; KLINKENBERG, L. G.; ZITOMER, R. S. Recruitment of Tup1-Ssn6 by yeast hypoxic genes and chromatin-independent exclusion of TATA binding protein. **Eukariotic Cell**, 2 (6): 1288-1303, 2003.

MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **The FEBS Journal**, 274: 976-989, 2007.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 29 (9): 2001-2007, 2001.

POYTON, R. O. Models for oxygen sensing in yeast: implications for oxygen-regulated gene expression in higher eucaryotes. **Respiration Physiology**, 155: 119-133, 1999.

PRIOR, C.; TIZZANI, L. ; FUKUHARA, H.; WÉSOLOWSKI-LOUVEL, M. *RAG3* gene and transcriptional regulation of the pyruvate decarboxylase gene in *Kluyveromyces lactis*. **Molecular Microbiology**, 20 (4), 765-772, 1996.

SERTIL, O.; KAPPOR, R.; COHEN, B. D.; ABRAMOVA, N.; LOWRY, C. V. Synergistic repression of anaerobic genes by Mot3 and Rox1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, 31: 5831-5837, 2003.

SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. J. V.; MANTOVANI, H. C., PASSOS, F. M. L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 930-936, 2005.

SCHMITT, M. E.; BROWN, T. A.; TRUMPOWER, B. L. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research** 18(10): 3091, 1990.

ZEEMAN, A-M.; KUYPER, M.; PRONK, J. T.; DIJKEN, P. V.; STEENSMA, H. Y. Regulation of pyruvate metabolism in chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. **Yeast**, 16: 611-620, 2000.

ZHANG, L; HACH, A. Review: Molecular Mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 56:41-426, 1999.

ZITOMER, R. S.; LOWRY, C. V. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, 56: 1-11, 1992.

ZITOMER, R. S.; LIMBACH, M. P.; RODRIGUEZ-TORRES, A. M.; BALASUBRAMANIAN, B.; DECKERT, J.; SNOW, P. M. Approaches to the study of Rox1 repression of the hypoxic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods**, 11: 279-288, 1997.

WESOLOWSKI-LOUVEL, M.; BREUNING, K. D. ; FUKUHARA, H. Genetics, biochemistry and molecular biology of non-conventional yeasts. **Spring Verlagedn**,1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 1A: Média CP \pm desvio padrão referente à cepa *K. lactis* MW270-7B.

<i>K. lactis</i> MW270-7B				
Média CP \pm Desvio padrão				
Gene	Tempo 0h (aerobiose)	Tempo 3h (hipoxia)	Tempo 6h (hipoxia)	Tempo 9h (hipoxia)
<i>KIACT1</i>	18,21 \pm 0,08	19,68 \pm 0,08	18,33 \pm 0,01	17,36 \pm 0,06
<i>KIAAC3</i>	18,06 \pm 0,05	19,95 \pm 0,04	17,74 \pm 0,1	16,84 \pm 0,07
<i>KICOX5B</i>	19,12 \pm 0,09	19,12 \pm 0,06	20,21 \pm 0,08	18,19 \pm 0,18
<i>KIHEM13</i>	22,38 \pm 0,12	23,27 \pm 0,003	21,66 \pm 0,03	19,61 \pm 0,02
<i>KIHAP1</i>	20,08 \pm 0,02	20,18 \pm 0,04	19,29 \pm 0,02	19,08 \pm 0,12
<i>KIRAG1</i>	19,13 \pm 0,08	21,69 \pm 0,03	20,16 \pm 0,02	19,12 \pm 0,05
<i>KIADH1</i>	18,25 \pm 0,08	21,87 \pm 0,05	20,31 \pm 0,05	18,25 \pm 0,02

Tabela 2A: Média CP \pm desvio padrão referente à cepa *K. lactis rox1* Δ .

<i>K. lactis rox1</i> Δ				
Média CP \pm Desvio padrão				
Gene	Tempo 0h (aerobiose)	Tempo 3h (hipoxia)	Tempo 6h (hipoxia)	Tempo 9h (hipoxia)
<i>KIACT1</i>	22,09 \pm 0,04	22,45 \pm 0,02	23,85 \pm 0,01	23,36 \pm 0,09
<i>KIAAC3</i>	20,15 \pm 0,01	20,82 \pm 0,1	21,44 \pm 0,09	21,73 \pm 0,01
<i>KICOX5B</i>	23,26 \pm 0,01	23,11 \pm 0,02	23,45 \pm 0,03	23,53 \pm 0,18
<i>KIHEM13</i>	24,87 \pm 0,12	24,4 \pm 0,09	24,86 \pm 0,09	25,22 \pm 0,1
<i>KIHAP1</i>	23,41 \pm 0,07	22,24 \pm 0,08	22,62 \pm 0,03	23,2 \pm 0,01
<i>KIRAG1</i>	20,87 \pm 0,04	22,17 \pm 0,05	23,59 \pm 0,03	23,28 \pm 0,07
<i>KIADH1</i>	21,36 \pm 0,05	22,42 \pm 0,07	23,77 \pm 0,06	23,46 \pm 0,03

APÊNDICE B

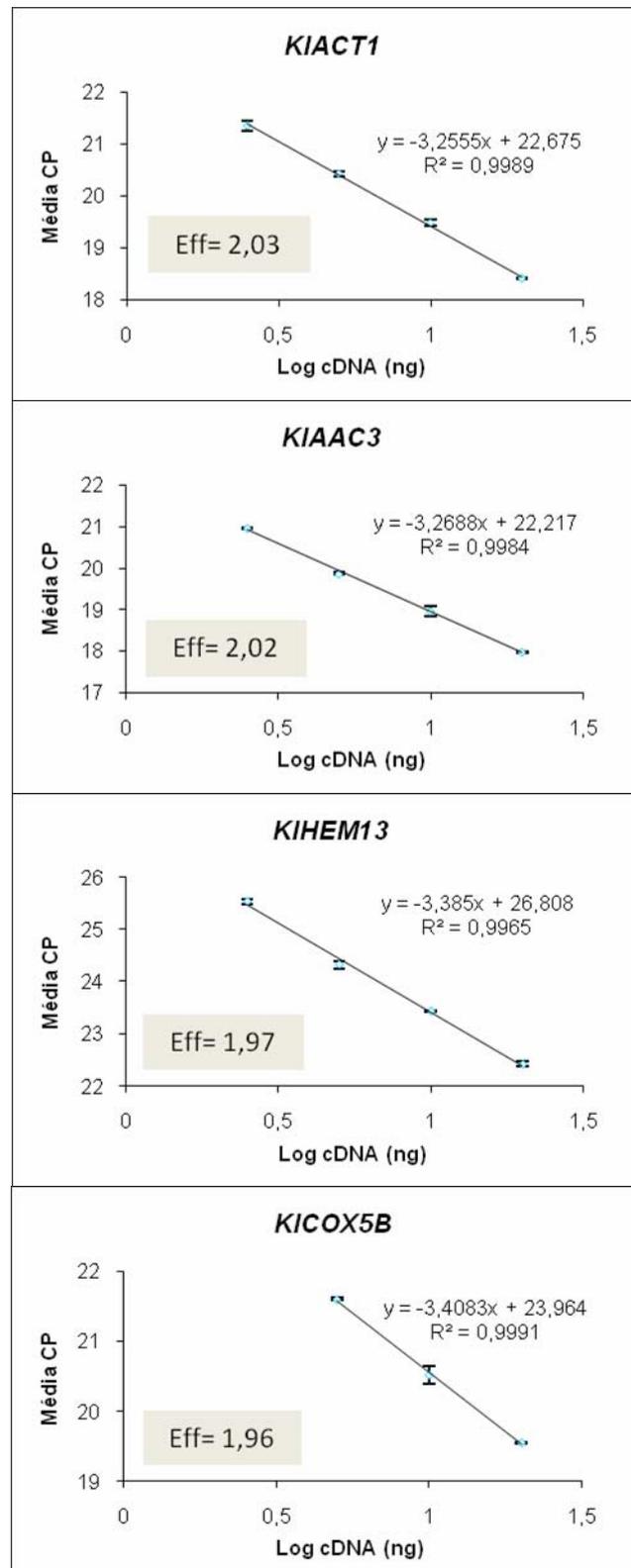


Figura 1B: Eficiência (Eff) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na expressão gênica por PCR em Tempo Real.

APÊNDICE B

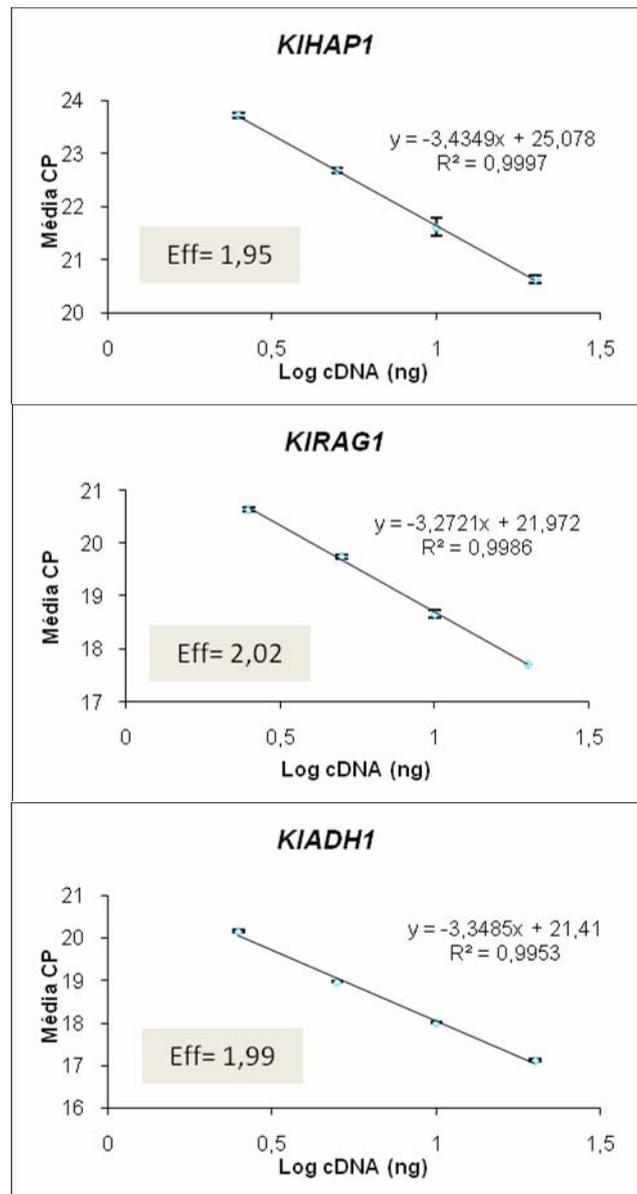


Figura 1B (continuação): Eficiência (Eff) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na expressão gênica por PCR em Tempo Real.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)